

# **Korrelationen zwischen der Struktur und der enzymatischen Hydrolyse von Polyestern**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des akademischen Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr.rer.nat.)  
genehmigte

## **Dissertation**

von  
**Elke Marten**, geb. Rantze  
aus Quakenbrück

1. Referent:	Prof. W.-D. Deckwer
2. Referent:	Prof. J. Klein
eingereicht am:	09.04.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am:	11.07.2000
	2000 (Druckjahr)

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### Publikationen:

Rantze, E. und R.-J. Müller: *Bioabbaubarkeit von Polymeren*; WKI-Bericht Nr. 32 (1997)

Rantze, E.; Kleeberg, I.; Witt, U.; Müller, R.-J. und W.-D. Deckwer: *Aromatic components in copolyesters: Model structures help to understand biodegradability*. Macromol. Chem. Phys. Macromol. Symp. 130 (1998) 319-326

Müller, R.-J.; Witt, U.; Rantze, E. und W.-D. Deckwer: *Architecture of biodegradable copolyesters containing aromatic constituents*. Polymer Degradation and Stability 59 (1998) 203-208

Müller, R.-J.; Rantze, E. und W.-D. Deckwer: *Welche Parameter bestimmen die Bioabbaubarkeit Ester-basierter Polymere?* 7. Fachtagung: Biologisch abbaubare Werkstoffe, Würzburg (2000) F1-F10

### Tagungsbeiträge:

Rantze, E.; Kleeberg, I.; Witt, U.; Müller, R.-J. und W.-D. Deckwer: *Aromatic components in copolyesters: Model structures help to understand biodegradability*. (Vortrag) 5<sup>th</sup> International Workshop on Biodegradable Polymers, Stockholm (1997)

Rantze, E. und R.-J. Müller: *Bioabbaubarkeit von Polymeren*. (Vortrag) Workshop des Wilhelm-Klauditz-Institut (WKI), Fraunhofer-Institut für Holzforschung: Klebstoffe für Holzwerkstoffe und Faserformteile – Neue Entwicklungen, Applikationen und Analysetechniken, Braunschweig (1997)

Rantze, E.: *Structural parameters influencing the biodegradability of polyesters*. (Vortrag) International Biodeterioration Research Group (IBRG) 8<sup>th</sup> Meeting of the Biodegradable Plastics Group, Hannover (1999)



## Danksagung

Herrn Prof. W.-D. Deckwer, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig, danke ich für die interessante Themenstellung, die großzügige Unterstützung dieser Arbeit mit Sachmitteln und dem regen Interesse an ihrer Entwicklung.

Herrn Prof. J. Klein, Institut für Makromolekulare Chemie der TU Braunschweig, danke ich für die Übernahme des Correferates.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Umweltverfahrenstechnik und Prozeßtechnik an der GBF danke ich für die Hilfsbereitschaft und die gute Arbeitsatmosphäre.

Besonders möchte ich Herrn Dr. R.-J. Müller für seine Unterstützung mit zahlreichen konstruktiven und motivierenden Diskussionen, die erheblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, danken.

Frau H. Schrader danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei den Synthesearbeiten, für die Durchführung von Abbauuntersuchungen in Erde und Kompost sowie die Unterstützung bei den DSC- und GPC-Messungen.

Frau N. Kolpack, die im Rahmen einer Studienarbeit der Fachhochschule Braunschweig/Wolfenbüttel PTSu-Copolyester synthetisiert hat, danke ich für ihre äußerst engagierte Mitarbeit. Besonders danken möchte ich auch Frau K. Welzel für die im Rahmen einer Diplomarbeit der Technischen Universität Braunschweig sehr sorgfältig durchgeführten Arbeiten zu vernetzten Polyestern.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. H.-J. Hecht für die konstruktiven Diskussionen und das Aufzeigen der röntgenkristallographischen Strukturen verschiedener Lipasen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. V. Wray für wertvolle Hinweise bei der Auswertung der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren.

Danken möchte ich auch meinen Eltern für die großzügige Unterstützung des Studiums. Von ganzem Herzen danke ich meinem Mann Jörg für sein Verständnis in den vergangenen Jahren. Für mich wäre ohne seine Mithilfe, insbesondere bei der Betreuung unseres Sohnes Paul, sicherlich vieles bedeutend schwieriger gewesen.



# Inhaltsverzeichnis

<b><i>Symbole und Abkürzungen</i></b> .....	<b>V</b>
<b><i>1 Zusammenfassung</i></b> .....	<b>1</b>
<b><i>2 Einleitung und Aufgabenstellung</i></b> .....	<b>3</b>
2.1 Stand des Wissens .....	3
2.2 Ziel der Arbeit .....	5
<b><i>3 Grundlagen</i></b> .....	<b>7</b>
3.1 Biologisch abbaubare Polymere .....	7
3.2 Der biologische Abbau .....	8
3.3 Strukturen bioabbaubarer Polymere .....	10
3.3.1 Aliphatische Homopolyester .....	10
3.3.2 Aliphatisch-aromatische Copolyester .....	11
<b><i>4 Ergebnisse und Diskussion</i></b> .....	<b>15</b>
4.1 Auswahl und Charakterisierung verwendeter Enzyme .....	15
4.1.1 Hydrolyse von niedermolekularen Modellestern .....	15
4.1.2 Hydrolyse von polymeren Modellestern .....	19
4.1.3 Charakterisierung der ausgewählten Lipasen .....	22
4.1.3.1 Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaktivität .....	22
4.1.3.2 Temperaturoptimum und -stabilität .....	24
4.1.3.3 Lösungsmiteleinfluß auf die Enzymaktivität der PsL .....	26
4.2 Niedermolekulare Modellester .....	28
4.2.1 Cycloaliphatische und aromatische Diester .....	28
4.2.2 Aromatische Oligoester .....	33
4.3 Aromatische Homopolyester .....	44
4.4 Aliphatische Homopolyester .....	47
4.4.1 Abstand der Estergruppen entlang der Polymerkette .....	47
4.4.1.1 Einfluß biologischer Faktoren auf den biologischen Abbau .....	50
4.4.1.2 Einfluß Polymer-spezifischer Faktoren auf den biologischen Abbau .....	53
4.4.1.2.1 Schmelztemperatur der Polyester .....	53
4.4.1.2.2 Löslichkeit von Abbauprodukten .....	58
4.4.2 Ausrichtung der Estergruppen entlang der Polymerkette .....	64
4.4.3 Kurzkettenverzweigte Polyester .....	66
4.4.4 Vernetzte Polyester .....	68

<b>4.5 Aliphatisch-aromatische Copolyester .....</b>	<b>74</b>
4.5.1 Charakterisierung der Copolyester.....	76
4.5.1.1 Charakterisierung der Mikrostruktur .....	76
4.5.1.1.1 Sequenzlängenberechnung von statistischen Copolyestern.....	76
4.5.1.1.2 Sequenzlängenbestimmung mittels $^{13}\text{C}$ -NMR .....	78
4.5.1.2 Thermische Charakterisierung .....	87
4.5.2 Untersuchungen zum biologischen Abbau der Copolyester .....	94
4.5.2.1 Variation der Terephthalsäurekonzentration .....	94
4.5.2.2 Variation der mittleren aromatischen Sequenzlänge .....	99
4.5.2.3 Variation der Länge der aliphatischen Säurekomponente .....	106
<b>5 Zusammenfassende Diskussion.....</b>	<b>111</b>
<b>6 Experimenteller Teil .....</b>	<b>121</b>
<b>6.1 Chemikalien und Enzyme .....</b>	<b>121</b>
<b>6.2 Synthesen .....</b>	<b>124</b>
6.2.1 Synthese von niedermolekularen Modelleestern .....	124
6.2.1.1 Aromatische, aliphatische und cycloaliphatische Diester .....	124
6.2.1.2 Synthese und Isolierung aromatischer Oligoester .....	126
6.2.2 Synthese von linearen Polyestern.....	129
6.2.2.1 Polykondensation in der Schmelze.....	129
6.2.2.2 Polykondensation in der Lösung.....	131
6.2.3 Synthese von kettenverlängerten und vernetzten Polyestern.....	131
6.2.3.1 Synthese von kettenverlängerten Polyestern.....	131
6.2.3.2 Synthese von vernetzten Polyestern .....	132
<b>6.3 Aufreinigung der Polyester mittels Lösungsfällung.....</b>	<b>134</b>
<b>6.4 Herstellung von Polyesterfilmen .....</b>	<b>134</b>
<b>6.5 Analytik der Syntheseprodukte .....</b>	<b>135</b>
6.5.1 Gelpermeationschromatographie (GPC) .....	135
6.5.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC) .....	135
6.5.3 Endgruppenbestimmungen.....	135
6.5.4 Charakterisierung der vernetzten Polyester.....	138
6.5.5 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie.....	139
<b>6.6 Bestimmung von Löslichkeiten .....</b>	<b>140</b>
<b>6.7 Bestimmung der Auflösegeschwindigkeit von Carbonsäuren .....</b>	<b>141</b>
<b>6.8 Abbauuntersuchungen.....</b>	<b>142</b>
6.8.1 Enzymatische Abbauuntersuchungen .....	142
6.8.1.1 Abbau niedermolekularer Modellester (Öle) .....	144



---

6.8.1.2	Abbau niedermolekularen Modellester (Feststoffe) .....	145
6.8.1.3	Abbau aromatischen Oligoester .....	146
6.8.1.4	Abbau von Polymerfilmen .....	146
6.8.2	Abbauuntersuchungen in Gegenwart von Mikroorganismen .....	147
6.8.2.1	Abbauuntersuchung in Erde .....	147
6.8.2.2	Abbauuntersuchungen in Kompost .....	148
6.8.2.3	Abbauuntersuchungen auf Agarplatten .....	150
<b>7</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>153</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>163</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>173</b>



## Symbole und Abkürzungen

A	Adipinsäure	-
Å	Angström	-
a-Chym	$\alpha$ -Chymotrypsin aus Rinderpankreas	-
B	1,4-Butandiol	-
BSA	Bovine serum albumin	-
BTA	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure	-
BTDod	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Dodecandisäure	-
BTK	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Korksäure	-
BTSeb	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Sebacinsäure	-
BTSu	Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Bernsteinsäure (Succinic acid)	-
c	molare Konzentration	[mol·l <sup>-1</sup> ]
CcL	Lipase von <i>Candida cylindracea</i>	-
CEN	Comité Européenne de Normalisation	-
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform	-
CvL	Lipase von <i>Chromobakterium viscosum</i>	-
Ø	Durchmesser	[cm]
d	Tag	-
$\rho$	Dichte	[g·ml <sup>-1</sup> ]
DIN	Deutsches Institut für Normung	-
DMF	N,N-Dimethylformamid	-
DMT	Dimethylterephthalat	-
DSC	Differential Scanning Calorimetry	-
EC	Enzyme Commission	-
ES(%)	Anteil der vorhandenen Esterbindungen, dessen Hydrolyse experimentell ermittelt wurde	[%]
ES <sub>exp</sub>	Experimentell ermittelter Anteil hydrolysierter Esterbindungen	[mmol]
ES <sub>th</sub>	Theoretisch vorhandener Anteil an hydrolysierbaren Esterbindungen	[mmol]
g	Gramm	[g]
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie	-
h	Stunde	[h]
$\Delta H$	Enthalpieänderung	[J·mol <sup>-1</sup> ]

HDI	Hexamethylendiisocyanat	-
HOMO	Höchstes besetztes Molekülorbital (highest occupied molecular orbital)	-
HR	Heizrate	[°C·min <sup>-1</sup> ]
KR	Kühlrate	[°C·min <sup>-1</sup> ]
l	Liter	[l]
LUMO	Niedrigste unbesetztes Molekülorbital (lowest unoccupied molecular orbital)	-
mbar	Millibar	[mbar]
MeOH	Methanol	-
min	Minute	-
M <sub>n</sub>	Zahlenmittel der Molmasse	[g·mol <sup>-1</sup> ]
M <sub>w</sub>	Gewichtsmittel der Molmasse	[g·mol <sup>-1</sup> ]
n	Molzahl	[mol]
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Natriumcarbonat, Natriumcarbonatlösung	-
NaOH	Natriumhydroxid, Natronlauge	-
NaWaRo	Nachwachsende Rohstoffe	-
NMR	Kernmagnetische Resonanzspektroskopie (nuclear magnetic resonance)	-
OHZ	Hydroxylzahl	[mg <sub>KOH</sub> ·(g <sub>Polymer</sub> ) <sup>-1</sup> ]
PA 6	Polyamid 6	-
PA 66	Polyamid 66	-
PBPh	Polybutylenphenylendiacetat	-
PBT	Polybutylenterephthalat	-
PCL	Polycaprolacton	-
PcL	Lipase von <i>Pseudomonas cepacia</i>	-
PE	Polyethylen	-
PET	Polyethylenterephthalat	-
PHA	Polyhydroxysäure	-
PHB	Polyhydroxybuttersäure	-
PLA	Polymilchsäure	-
PLLA	Poly(L-milchsäure)	-
PsL	Lipase von <i>Pseudomonas spezie</i> s	-
PTSu	Copolyester aus 1,3-Propandiol, Terephthalsäure und Bernsteinsäure (Succinic acid)	-
PVA	Polyvinylalkohol	-
r	Copolymerisationsparameter	-
RI	Brechungsindex (refractive index)	-
RmL	Lipase von <i>Rhizomucor miehei</i>	-

---

$\overline{SL}$	Mittlere Sequenzlänge	-
$\Delta S$	Entropieänderung	$[J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}]$
Sdp.	Siedepunkt	$[^{\circ}C]$
sOHZ	scheinbare Hydroxylzahl	$[mg_{KOH} \cdot (g_{Polymer})^{-1}]$
SP	Gesättigter Polyester (saturated Polyester)	-
SZ	Säure-Zahl	$[mg_{KOH} \cdot (g_{Polymer})^{-1}]$
t	Zeit	[min]
T	Terephthalsäure	-
TFA	Trifluoressigsäure	-
TfL	Lipase von <i>Thermomonospora fusca</i>	-
$t_{Lauge}$	Titer der Lauge	-
$T_m$	Schmelztemperatur	$[^{\circ}C]$
$T_{Me\beta}$	Meßtemperatur	$[^{\circ}C]$
UPM	Umdrehungen pro Minute	$[min^{-1}]$
$U_R$	Unordnungsgrad	-
UV	Ultraviolett	-
V	Volumen	[l]
w	Woche	[w]
$W_{A(n)}$	Zahlenanteil der aliphatischen Sequenzen (A) mit der Sequenzlänge n	-
WgL	Lipase von <i>Wheat germ</i>	-
$W_{T(n)}$	Zahlenanteil der aromatischen Sequenzen (T) mit der Sequenzlänge n	-



# 1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden strukturell unterschiedliche niedermolekulare und polymere Ester synthetisiert und in Abhängigkeit von der Struktur auf ihre enzymatische (lipolytischen) Hydrolysegeschwindigkeit untersucht. Die Ergebnisse der enzymatischen Laboruntersuchungen mittels Lipase von *Pseudomonas spezieis* waren prinzipiell vergleichbar mit Abbauergebnissen, die in praxisnahen Testsystemen (in Erde bzw. Kompost) erzielt wurden.

Zur Überprüfung der generellen Spaltbarkeit verschiedener Esterstrukturen wurden zunächst Abbauuntersuchungen an niedermolekularen Modellestern durchgeführt. Die Lipase hydrolysierte sowohl aliphatische (z.B. Dibutyladipat), als auch aromatische (z.B. Dibutylterephthalat) niedermolekulare Modellester.

Im Gegensatz zu den niedermolekularen Modellestern, die alle enzymatisch spaltbar waren, erwiesen sich die von aromatischen bzw. cycloaliphatischen Säuren abgeleiteten Polyester als nicht bzw. nur sehr langsam enzymatisch hydrolysierbar.

Die Abbaugeschwindigkeiten von linearen aliphatischen Polyestern (z.B. Polytetramethylensuccinat, Polytetramethylenadipat) unterschieden sich stark und zeigten eine direkte Abhängigkeit von der Differenz zwischen der Polyesterschmelztemperatur und der Abbautemperatur. Mit zunehmender Temperaturdifferenz sanken die enzymatischen Abbauraten der Polyester.

Aliphatische Polyester mit Methylseitengruppen wurden deutlich langsamer enzymatisch hydrolysiert, als die analogen linearen Polyester. Aliphatische Prepolyester, die über trifunktionelle aliphatische Isocyanate zu dreidimensionalen Netzwerken polyaddiert waren, ergaben nur äußerst geringe enzymatische Abbauraten.

Weiterhin wurden aliphatisch-aromatische Copolyester (bestehend aus 1,4-Butandiol, Adipinsäure und Terephthalsäure) mit konstantem Terephthalsäureanteil (50 mol-% des Gesamtsäureanteils) synthetisiert, die sich in der Mikrostruktur unterschieden (z.B. alternierende Abfolge von aromatischen und aliphatischen Wiederholungseinheiten). Bei der thermischen Charakterisierung erwies sich die Schmelztemperatur der Copolyester als direkt abhängig von der mittleren aromatischen Sequenzlänge. Analog zu den linearen aliphatischen Homopolyestern, korrelierten auch die enzymatischen Abbauraten der linearen aliphatisch-aromatischen Copolyester mit der Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelztemperatur und Abbautemperatur.





## 2 Einleitung und Aufgabenstellung

Aufgrund ihrer hervorragenden mechanischen und zum Teil auch thermischen Eigenschaften und speziell wegen ihrer Stabilität und Langlebigkeit haben polymere Werkstoffe eine breite Anwendung in vielen Bereichen gefunden. Vor dem Hintergrund zunehmender Probleme der Abfallentsorgung (Verknappung des Deponieraumes, Probleme beim Kunststoffrecycling) wurde seit Ende der 70er Jahre die Entwicklung von Materialien intensiviert, die einerseits Verarbeitungs- und Anwendungsmöglichkeiten aufweisen wie herkömmliche Kunststoffe (z.B. thermoplastische Verarbeitbarkeit), andererseits aber durch Mikroorganismen abgebaut werden können. Solche biologisch abbaubaren Polymerwerkstoffe (BAW) können insbesondere in Bereichen, in denen das werk- oder rohstoffliche Recycling konventioneller Kunststoffe mit einem hohen Energieeinsatz für Sammlung, Transport, Reinigung und Aufarbeitung verbunden ist, eine ökologisch sinnvolle Alternative zu konventionellen Kunststoffen darstellen [BICHLER et al. 1993].

Unter den biologisch abbaubaren Polymeren stellen Polyester, neben Stärke und Cellulose, die mengenmäßig wichtigste Stoffklasse dar [WITT et al. 1997]. Bei dem durch mikrobielle Synthese zugänglichen Polyester Polyhydroxybutyrat (PHB) ist eine gezielte Variation der Polymereigenschaften nur eingeschränkt möglich. Die Herstellung von maßgeschneiderten biologisch abbaubaren Kunststoffen aus Monomeren, die in ausreichender Menge verfügbar sind, stellt somit eine wichtige Herausforderung dar.

Synthetische Polyester, die ausschließlich aus aliphatischen Monomeren aufgebaut sind, weisen zwar eine gute biologische Abbaubarkeit auf [WITT et al. 1994], sind aber aufgrund ihrer z.T. mäßigen thermischen und mechanischen Eigenschaften (niedrige Schmelztemperaturen, geringe Zugfestigkeit) nur äußerst eingeschränkt anwendbar. Aromatische Polyester wie Polybutylenterephthalat (PBT) zeigen dagegen bei guten Materialeigenschaften keinen meßbaren biologischen Abbau.

Spezielle aliphatisch-aromatische Copolyester aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure (BTA-Copolyester) verbinden gute Materialeigenschaften mit der biologischen Abbaubarkeit [WITT 1996, WARZELHAN et al. 1996]. Aufgrund der ausreichenden Verfügbarkeit der Rohstoffe lassen sich so relativ preiswerte BAW (z.B. Ecoflex® für ca. 5 bis 7 DM/kg von der BASF AG; Eastar Bio® von EASTMAN-CHEMICAL) mit den für Polypropylen typischen Verarbeitungs- und Materialeigenschaften herstellen [BASF AG 1997].

### 2.1 Stand des Wissens

Aliphatische Polyester wurden in bezug auf ihre Abbaubarkeit intensiv untersucht [WALTER et al. 1995]. Die primäre Spaltung der üblicherweise wasserunlöslichen Polymerketten erfolgt

außerhalb der Mikroorganismen und wird von speziellen Enzymen katalysiert, die von Mikroorganismen wie Bakterien oder Pilzen gebildet und ausgeschieden werden. Der enzymatische Abbau erfolgt an der Polymeroberfläche und nimmt daher mit der dem Enzym zur Verfügung stehenden Polyesteroberfläche zu [TOKIWA et al. 1988]. Die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse (Primärabbau) erwies sich als weitestgehend unabhängig von der Molmasse der Polyester (oberhalb einer Molmasse von ca.  $\bar{M}_n = 4000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  wurde kein Einfluß der Molmasse beobachtet). Daraus kann geschlossen werden, daß die Polyesterketten durch das Enzym nach einem Endo-Mechanismus statistisch gespalten werden, d.h. die Kettenspaltung erfolgen innerhalb der Polyesterketten und nicht ausschließlich an den Kettenenden [TOKIWA und SUZUKI 1978].

Verschiedene Autoren beschrieben einen Einfluß der Polyesterschmelztemperatur auf die Abbaugeschwindigkeit. So wurde ein im Vergleich zu den analogen Homopolyestern (Polycaprolacton=PCL und SP 6/6) niedriger schmelzender aliphatischer PCL-SP6/6-Copolyester schneller enzymatisch gespalten, als die entsprechenden Homopolymere. Daraus schlossen TOKIWA und SUZUKI (1978), daß nicht nur die chemische Primärstruktur der Polyesterketten die Abbaugeschwindigkeit bestimmt, sondern darüber hinaus auch die Polyesterschmelztemperatur und die Kristall-Morphologie.

Auch WITT (1996) beschrieb für aliphatische Polyester eine Abhängigkeit der enzymatischen Abbauraten von der Polyesterschmelztemperatur [WITT 1996].

Untersuchungen zum Einfluß der Morphologie liegen für den bakteriellen Polyester Polyhydroxybuttersäure (PHB) vor [CANETTI et al. 1999, SPYROS et al. 1997]. PHB-Polymerfilme, die sich aufgrund unterschiedlicher thermischer Vorbehandlungen in der Kristallinität unterscheiden, wurden mit steigender Kristallinität langsamer von den PHB-Depolymerasen gespalten. Untersuchungen an PHB-Einkristallen zeigten einen enzymatischen Abbau zunächst an Kristallbereichen, deren Polyesterketten vergleichsweise wenig geordnet waren [ABE und DOI 1999, IWATA et al. 1999].

Der Einfluß der chemischen Polyesterstruktur wird in der Literatur ebenfalls diskutiert. Polyester mit aromatischen Komponenten oder verzweigten Kettenbereichen tendieren zu einer größeren Resistenz gegenüber mikrobiellen Angriffen, als lineare aliphatische Polyester [AMINABHAVI et al. 1990]. Copolymere aus aliphatischen und aromatischen Polyestern sind jedoch in Abhängigkeit von ihrem Aromatenanteil einem mikrobiellen Angriff zugänglich [WITT 1996, TOKIWA und SUZUKI 1978], wobei die Abbaugeschwindigkeit mit zunehmendem Aromatengehalt sinkt. Die Resistenz aromatischer Homopolyester wird mit der geringen Flexibilität der Polyesterketten erklärt [HUANG 1985] bzw. auf deren zumeist hohe Schmelztemperaturen zurückgeführt [TOKIWA und SUZUKI 1981] oder auch mit den

unterschiedlichen aliphatischen und aromatischen Sequenzlängen begründet [VAN Der ZEE 1997].

Untersuchungen an vernetzten Polyanhydride [ALBERTSSON und EKLUND 1996] und vernetzten Polyestern [BAHARI et al. 1998] ergaben geringe Hydrolysegeschwindigkeiten im Vergleich zu den analogen unvernetzten Strukturen. Als Begründung wurde eine verringerte Kettenmobilität angeführt [HUANG 1989].

Die in der Literatur zur Erklärung von Unterschieden in den enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeiten der Polyester diskutierten Parameter lassen sich in zwei Gruppen teilen:

- mikroskopische Polymereigenschaften (Kettenstruktur):  
Abstand bzw. Ausrichtung der Estergruppen innerhalb der Polyesterketten, Seitengruppen, Vernetzungen, Sequenzlängen
- makroskopische Polymereigenschaften:  
Schmelztemperatur, Hydrophobizität und Kristallinität.

Die bisherigen Ergebnisse wurden oftmals nur in empirischen praxisnahen Testsystemen (Abbauuntersuchungen in Erde bzw. Kompost) erzielt oder es wurde ausschließlich ein spezieller Parameter (z.B. die Zusammensetzung von Copolyestern) betrachtet, ohne auf die Änderung damit einhergehender makroskopischer Substrateigenschaften (z.B. Schmelztemperatur) einzugehen. Für die auf ihren biologischen Abbau untersuchten vernetzten Strukturen lagen keine eindeutigen Aussagen über die detaillierten Polymerstrukturen vor.

## **2.2 Ziel der Arbeit**

Ausgehend von den offenen Fragen bestand die Aufgabe dieser Arbeit darin, anhand von definierten Modellstrukturen (niedermolekulare und polymere Modellester) mittels reproduzierbarer Laborversuche systematische Untersuchungen durchzuführen, um so Aussagen zum Zusammenhang zwischen verschiedenen Strukturparametern und der biologischen Abbaubarkeit von Polyestern zu erhalten.

Die Kenntnisse bezüglich solcher Zusammenhänge ist, über das akademische Interesse hinaus, in zweierlei Hinsicht für die Entwicklung und Anwendung bioabbaubarer Kunststoffe von Bedeutung:

- Struktur-Bioabbaubarkeits-Korrelationen ermöglichen eine gezielte Synthese maßgeschneiderter Polymere, die Bioabbaubarkeit mit möglichst guten Anwendungseigenschaften verknüpfen.

- Ist bekannt, wie der biologische Abbau von Polyestern verläuft, lassen sich wichtige Schlüsse über eventuelle Umweltbeeinträchtigungen (z.B. Akkumulation von Intermediaten) ziehen.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit konzentrieren sich auf Oligoester (mit aromatischen, aliphatischen bzw. cycloaliphatische Säuren) und auf drei Gruppen von Polyestern (aromatische Homopolyester, aliphatische Homopolyester bzw. aliphatisch-aromatische Copolyester).

Ausgehend von den technisch relevanten aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyestern, sollte mit Hilfe oligomerer Modellester zunächst die prinzipielle Spaltbarkeit der Esterbindungen aromatischer Säuren untersucht werden.

Bei der Gruppe der aliphatischen Homopolyester war zu klären, wie Veränderungen in der chemischen Primärstruktur (z.B. der Abstand und die Ausrichtung der Estergruppen entlang der Polymerketten, Methylseitengruppen bzw. Vernetzungen) die Geschwindigkeit der enzymatischen Hydrolyse beeinflussen.

Bei den aliphatisch-aromatischen Copolyestern sollte einerseits untersucht werden, wie sich die Änderung der Zusammensetzung auswirkt. Zum anderen war zu klären, wie sich bei einer konstanten Zusammensetzung die Änderung der aromatischen und aliphatischen Sequenzlängen auswirkt.

Die enzymatischen Untersuchungen wurden vorwiegend mit einer Lipase von *Pseudomonas spezies* (z.T. auch mit einer thermophilen Lipase von *Thermomonospora fusca*) durchgeführt. Um eine Übertragbarkeit der so erhaltenen Ergebnisse auf die Praxis (z.B. Entsorgung bioabbaubarer Polymere mittels Kompostierung) sicherzustellen, wurden neben den enzymatischen Laboruntersuchungen auch Untersuchungen in Erde und Kompost durchgeführt.

## **3 Grundlagen**

### **3.1 Biologisch abbaubare Polymere**

In der Regel sind konventionelle technische Polymere wie Polyethylen und Polystyrol einem biologischen Abbau nicht zugänglich [AMINABHAVI et al. 1990]. Weder reine Polyolefine noch Polyolefine mit oxidativen Zusätzen zur chemischen Molmassenreduktion oder mit Stärke geblendete Polyolefine führten bislang zu Produkten, die im Sinne einer Metabolisierung in ausreichender Geschwindigkeit bioabbaubar wären [PETER et al. 1996, HENKEL REFERATE 1996].

Eine Ausnahme stellt Polyvinylalkohol dar, für das trotz seiner Kohlenstoffhauptkette ein biologischer Abbau nachgewiesen wurde [BAINES 1973, SAKAZAWA et al. 1981]. Dabei erfolgt eine primäre enzymatische Oxidation der Hydroxylseitengruppe mit anschließender - dem Fettabbau analoger - enzymatischer Spaltung der Hauptkette [SAKAI et al. 1986]. Natürliche Kautschuke (Latex) sind ebenfalls biologisch abbaubar, wobei die für technische Anwendungen notwendige Nachvernetzung (Vulkanisation) die Abbaubarkeit jedoch drastisch reduziert [MEIER et al. 1996].

Natürliche Polymere wie Proteine, Cellulose, Stärke und Lignin enthalten Heteroatome wie Stickstoff und Sauerstoff in der Hauptkette, die Angriffspunkte für hydrolytische und oxidative Prozesse von Enzymen darstellen. So sind alle natürlichen Polymere biologisch abbaubar [TIMMINS und LENZ 1994].

Auch die meisten als biologisch abbaubar angesehenen Polymere weisen Heteroatome in der Polymerhauptkette auf, die einen enzymatischen Angriff ermöglichen. Mit Ausnahme von Polyvinylalkohol (PVA), das keine Heteroatome in der Polymerkette besitzt, erfüllen alle biologisch abbaubaren Polymere zwei Grundvoraussetzungen:

- In der Polymerkette liegen enzymatisch spaltbare Bindungen vor und
- die entstehenden Spaltprodukte werden von Bakterien und Pilzen verstoffwechselt.

Für die Funktion der biologischen Abbaubarkeit von Polymeren ist somit ausschließlich die Polymerstruktur, nicht jedoch die Herkunft der Monomere maßgeblich. Gemäß der Polymerbasis lassen sich biologisch abbaubare Polymere in vier Gruppen einteilen [WITT et al. 1997].

Tab. 3-1: Einteilung biologisch abbaubarer Polymere nach der Polymerbasis [WITT et al. 1997].

Polymerbasis	Vorteile	Nachteile	Beispiele
Natürliche <i>Polymere</i>	Nachwachsende Rostoffe (NaWaRo), z.T. preiswert	geringe Werkstoffreproduzierbarkeit, geringe Variabilität der Materialeigenschaften	Stärke, Cellulose, PHB
Modifizierte natürliche <i>Polymere</i>	z.T. NaWaRo, Variabilität der Materialeigenschaften	z.T. teuer, schwierige Strukturkontrolle	Celluloseacetat, Stärkeacetat
Fermentativ erzeugte <i>Monomere</i>	NaWaRo, gute Strukturkontrolle, gute Werkstoffreproduzierbarkeit	teuer	PLA
Petrochemisch erzeugte <i>Monomere</i>	gute Materialeigenschaften, preiswert, gute Werkstoffreproduzierbarkeit, schnelle Synthese	keine NaWaRo	Polyesteramid, Polyesterurethan, aliphatischer Homopolyester, aliphatisch-aromatischer Copolyester

### Wirtschaftliche Bedeutung

Biologisch abbaubare Polymere bieten Einsatzmöglichkeiten als Hilfs- und Werkstoffe. Eine Übersicht über Einsatzbereiche biologisch abbaubarer Werkstoffe im Verpackungs-, Hygiene-, Agrar- und Medizinbereich oder als Verbundmaterialien gibt die Studie des Franz-Patat-Zentrums, Braunschweig [WITT et al. 1997]. Der Einsatz von biologisch abbaubaren Werkstoffen für kurzlebige Produkte erscheint unter gemäßigten klimatischen Bedingungen für viele Applikationen möglich. Bis auf wenige spezielle Anwendungen (z.B. Füllmaterial oder Eßgeschirr auf Basis von Stärke, kompostierbare Müllbeutel oder Gemüseverpackung aus Polycaprolacton-Stärke-Blends), die sich z.T. noch im Pilotstadium befinden, weisen biologisch abbaubare Polymere derzeit jedoch noch eine geringe wirtschaftliche Relevanz auf. Trotz der geringen Produktmengen könnte die Vielzahl der Anwendungsmöglichkeiten dennoch einen interessanten Markt eröffnen.

## 3.2 Der biologische Abbau

Der biologische Abbau von wasserunlöslichen polymeren Substanzen erfolgt als komplexer mehrstufiger Vorgang unter Einwirkung von Enzymen auf spezifische Strukturmerkmale der Polymere (z.B. Ester- oder Amidbindungen). Die hochmolekularen, in der Regel nicht wasserlöslichen Polymere können nicht direkt in die mikrobiellen Zellen aufgenommen werden. Enzyme (extrazelluläre Enzyme = Exoenzyme) spalten die Polymerkette zunächst in

wasserlösliche Bruchstücke. Diese werden dann durch die Membran der Mikroorganismenzelle transportiert und innerhalb der Zelle durch intrazelluläre Stoffwechselvorgänge zu natürlichen Stoffwechselprodukten (u.a. Wasser, Kohlendioxid und Biomasse) metabolisiert. Oftmals ist die anfängliche enzymatische Kettenspaltung (= PRIMÄRABBAU) der die Abbaugeschwindigkeit bestimmende Schritt.

### Definitionen und Testverfahren

Im Gegensatz zu niedermolekularen Substanzen (z.B. Tensiden), für die schon seit Jahren verbindliche Definitionen für die Eigenschaft der biologischen Abbaubarkeit existieren [OECD-Guidelines, 1992], wurden Definitionen und Testverfahren bezüglich der biologischen Abbaubarkeit polymerer Substanzen erst in den letzten Jahren formuliert. So wurden von verschiedenen Organisationen (International Standardization Organisation, ISO; Comité Européenne de Normalisation, CEN; American Society for Testing and Materials, ASTM; Deutsches Institut für Normung, DIN; Biodegradable Plastics Society, Japan) Normverfahren erarbeitet, die eine Basis zur Beurteilung bioabbaubarer polymerer Werkstoffe darstellen.

Gemäß der DIN V 54900 (1998) zur „Prüfung der Kompostierbarkeit von Kunststoffen“ werden die Begriffe „Bioabbau“ und „Bioabbaubarkeit“ für Kunststoffe wie folgt definiert:

**Bioabbau:** Der Bioabbau eines Kunststoffes ist ein durch biologische Aktivität hervorgerufener Prozeß, der zu natürlich vorkommenden metabolischen Endprodukten über eine Veränderung der chemischen Struktur führt.

**Bioabbaubar:** Ein Kunststoff wird bioabbaubar genannt, wenn alle organischen Bestandteile einem vollständigen biologischen Abbau unterliegen. Bedingungen und Abbaugeschwindigkeit werden durch Standard-Test-Methoden ermittelt.

In dieser Arbeit wird nicht die Metabolisierung, d.h. der biologische Abbau gemäß DIN V 54900 (1998) gemessen, sondern vorwiegend die enzymatische Hydrolyse. Häufig bestimmt die enzymatische Hydrolyse als geschwindigkeitsbestimmender Schritt die Geschwindigkeit des Bioabbaus von Polymeren.

**Enzymatische Hydrolyse:** Enzyme katalysieren die Spaltung von Kunststoffen zu niedermolekularen Spaltprodukten.

Generell kann zur Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit eine Kombination verschiedene Untersuchungsmethoden herangezogen werden (Abb. 3-1).

Abb. 3-1:  
Praktische Relevanz  
und analytische  
Möglichkeiten  
verschiedener  
Testmethoden  
[MÜLLER 1994].

Analytische Aussagen			Praxisnähe	
Labor-Test			Simulations-Test	Feld-Test
Enzym-Test	Clear-zone-test	STURM-Test	Erde, Wasser, Kompost	Erde, Wasser, Kompost
Ein- oder Mehrenz-System	Mikro-organismen-Reinstamm	Mikro-organismen-Mischkultur	komplexes System	komplexes System
definiertes Medium			definierte externe Bedingungen	variierende externe Bedingungen

Labor-Tests mit Enzymen oder Mikroorganismen in synthetischem Medium (Clear-zone-test bzw. STRUM-Test) erlauben eine analytische Erfassung der Abbauprozesse. Zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Praxis sollten Simulations- und Feld-Tests durchgeführt werden. In dieser Arbeit wurde an einigen Polyestern die generelle Übertragbarkeit der Ergebnisse der enzymatischen Abbauntersuchungen auf praxisnahe Testsysteme (Erde bzw. Kompost) gezeigt.

### 3.3 Strukturen bioabbaubarer Polymere

#### 3.3.1 Aliphatische Homopolyester

Die Nomenklatur der linearen aliphatischen Homopolyester erfolgt nach der Vorschrift des Deutschen Institutes für Normung DIN 7728. Demnach wird bei gesättigten Polyestern (saturated Polyester= SP), bestehend aus Diol und Dicarbonsäure, die Anzahl der Kohlenstoffatome des Diols und der Disäure als Zahlenwerte nach dem Kürzel SP angeführt, z.B. SP 3/6 für den aliphatischen Homopolyester aus 1,3-Propandiol und Adipinsäure (Tab. 3-2).



Tab. 3-2: Beispiele für die Nomenklatur linearer, aliphatischer Homopolyester.

Monomere Diol/ Dicarbonsäure	Strukturbezogener Name nach IUPAC <sup>a)</sup>	Kurzzeichen nach DIN 7728
1,3-Propandiol/ Adipinsäure	Poly-(trimethylenadipat)	SP 3/6
1,4-Butandiol/ Adipinsäure	Poly-(tetramethylenadipat)	SP 4/6
1,4-Butandiol/ Dodecandisäure	Poly-(tetramethyldodecanoat)	SP 4/12

<sup>a)</sup> IUPAC= International Union of Pure and Appplied Chemistry

### 3.3.2 Aliphatisch-aromatische Copolyester

Viele aliphatische Homopolyester sind zwar biologisch abbaubar, finden jedoch aufgrund ihrer Materialeigenschaften (geringe Schmelztemperatur und Zugfestigkeit) nur eingeschränkt technische Anwendung. Demgegenüber weisen aromatische Homopolyester (PET), Polyamide (PA 6 und PA 66) oder Polyurethane gute Materialeigenschaften auf, sind jedoch nicht biologisch abbaubar (Abb. 3-2).

Durch die geeignete Kombination der biologisch abbaubaren aliphatischen Polyester mit den biologisch innerten Polymeren gelang die Entwicklung von biologisch abbaubaren Copolymeren, die technischen Einsatz finden (z.B. Polyesteramid BayerTir® der BAYER AG, aliphatisch-aromatischer Copolyester Ecoflex® der BASF AG). Durch konventionelle Polykondensationstechnik sind statistische aliphatisch-aromatische Copolyester herstellbar, die innerhalb bestimmter Grenzen der Zusammensetzung biologisch abbaubar sind [WITT 1996, Patent Offenlegungsschrift DE 4440858 A1].

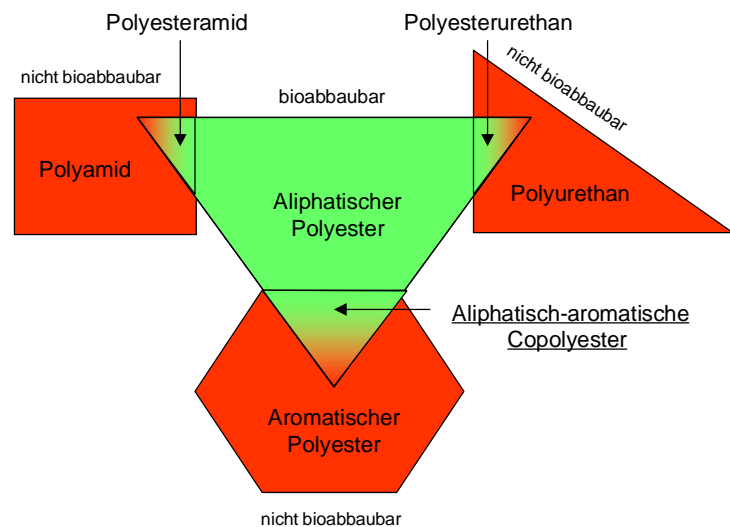


Abb. 3-2:  
Biologisch abbaubare  
Copolymere, die sich von  
bioabbaubaren alipha-  
tischen Polyestern ableiten.

Aufgebaut sind die statistischen aliphatisch-aromatischen Copolyester aus aliphatischen und aromatischen Repetiereinheiten aufgebaut (Abb. 3-3).

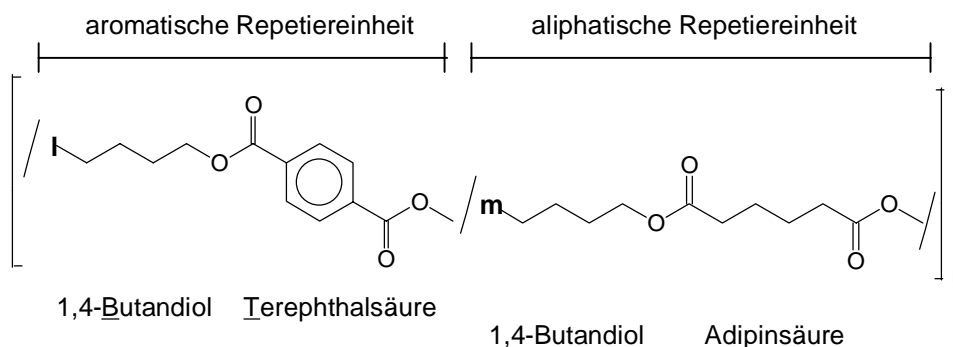


Abb. 3-3: Strukturformel von aliphatisch-aromatischen BTA- Copolyestern mit einer statistischen Verteilung der Säurekomponenten.  
Die Variablen  $l$  und  $m$  geben die Zusammensetzung an, z.B. BTA 50:50 mit  $l=m$ .

Die strukturbezogenen Namen einiger Copolyester sind in der folgenden Tab. 3-3 aufgeführt (nach IUPAC: International Union of Pure and Appplied Chemistry).

Tab. 3-3: Beispiele für die Nomenklatur von aliphatisch-aromatischen Copolyestern.

Monomere (Diol, aromatische und aliphatische Disäure)	Strukturbezogener Name nach IUPAC	Kurzform
1,4-Butandiol, Terephthalsäure, Succinic acid	Poly-[(tetramethylensuccinat)-co-(tetramethylenterephthalat)]	BTSu
1,4-Butandiol, Terephthalsäure, Adipinsäure	Poly-[(tetramethylenadipat)-co-(tetramethylenterephthalat)]	BTA
1,4-Butandiol, Terephthalsäure, Korksäure	Poly-[(tetramethylensuberat)-co-(tetramethylenterephthalat)]	BTK
1,4-Butandiol, Terephthalsäure, Sebacinsäure	Poly-[(tetramethylendecanoat)-co-(tetramethylenterephthalat)]	BTSeb
1,4-Butandiol, Terephthalsäure, Dodecandisäure	Poly-[(tetramethylendodecanoat)-co-(tetramethylenterephthalat)]	BTDod
1,3-Propandiol, Terephthalsäure, Succinic acid	Poly-[(trimethylensuccinat)-co-(trimethylenterephthalat)]	PTSu

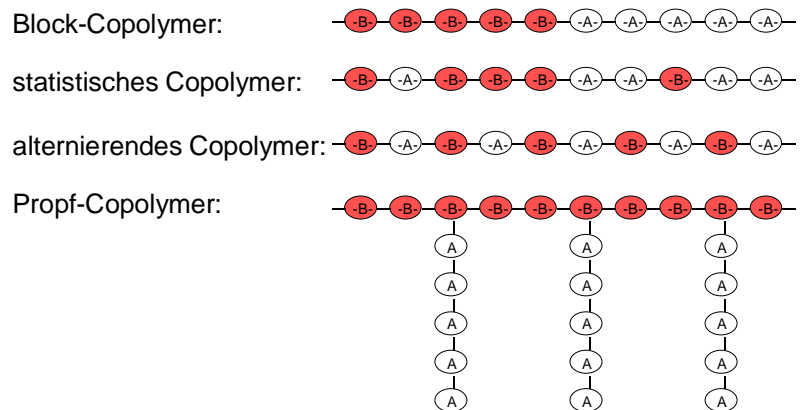
In dieser Arbeit werden anstelle der langen IUPAC-Namen Kurzformen zur Bezeichnung der Copolyester verwendet. Dazu werden die Anfangsbuchstaben der im Copolyester enthaltenen Monomere aneinandergereiht, wobei sich der erste Buchstabe auf das Diol (B für 1,4- Butandiol), der zweite Buchstabe auf die aromatische Disäure (T für Terephthalsäure) und der dritte Buchstabe auf die aliphatische Disäure (A für Adipinsäure)

bezieht. Hinter der Buchstabenfolge werden, durch einen Doppelpunkt getrennt, der prozentuale stöchiometrische Anteil der aromatischen Repetiereinheit und der aliphatischen Repetiereinheit angegeben, z.B. BTA 40:60 (Tab. 3-3).

Die bioabbaubaren aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester werden üblicherweise mittels Schmelzkondensation aus 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure synthetisiert, so daß die aromatischen und aliphatischen Repetiereinheiten in der Polymerkette statistisch verteilt vorliegen (Abb. 3-4).

In Abhängigkeit von der Polymersynthese können Copolymere neben der statistischen Struktur, eine blockweise oder alternierende Anordnung der Repetiereinheiten besitzen oder als Propf-Copolymere vorliegen [Abb. 3-4 aus VOLLMERT 1988].

Abb. 3-4:  
Mikrostruktur von binären  
Copolymeren  
[VOLLMERT 1988].



Systematische Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von BTA-Copolyestern liegen bislang nur für Copolyester mit statistischer bzw. Block-Struktur vor. In dieser Arbeit werden darüber hinaus Copolyester mit einer alternierenden Mikrostruktur auf ihre enzymatische Hydrolyse untersucht.



## 4 Ergebnisse und Diskussion

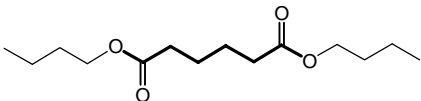
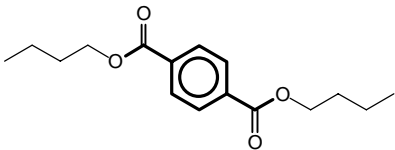
### 4.1 Auswahl und Charakterisierung verwendeter Enzyme

#### 4.1.1 Hydrolyse von niedermolekularen Modellestern

Für die vergleichenden Untersuchungen zur biologischen Abbaugeschwindigkeit von verschiedenen niedermolekularen und polymeren Modellestern wurde von den in Abb. 3-1 (Seite 10) aufgeführten Testsystemen die Laboruntersuchung mittels Enzymen gewählt, die bei guter Reproduzierbarkeit nur kurze Untersuchungszeiträume erfordert [AUGUSTA et al. 1992]. Für die enzymatischen Untersuchungen wurde zunächst ein geeignetes Enzym gesucht. Um möglichst generelle Aussagen zur Korrelation zwischen der biologischen Abbaubarkeit und der chemischen Struktur von Polyestern zu erhalten, sollte das Enzym wenig substratspezifisch sein. Im Hinblick auf eine spätere analytische Untersuchung der Abbauprodukte sollte das Enzym eine möglichst hohe spezifische Enzymaktivität aufweisen, um die Proteinkonzentration im Testansatz gering zu halten.

Als Substrate für das Enzymscreening wurden zunächst zwei niedermolekulare Modellester (Tab. 4-1) eingesetzt. Der Einsatz niedermolekularer Substrate ermöglicht eine von polymerspezifischen Parametern (z.B. Molmasse oder Kristallinität) unabhängige Bestimmung von Enzymaktivitäten. Die gegenüber den niedermolekularen Ester gemessenen spezifischen Enzymaktivitäten wurden mit den Aktivitäten gegenüber zwei ausgewählten Polyestern verglichen.

Tab. 4-1: Charakteristische Daten zweier Modellester mit wesentlichen Strukturmerkmalen des aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyesters.

Struktur	Name	M [g·mol <sup>-1</sup> ]	Sdp. [°C]
	Adipinsäure- dibutylester, <u>1</u>	258,36	179 bei 39 mbar
	Terephthalsäure- dibutylester, <u>2</u>	278,35	205 bei 10 mbar

Als niedermolekulare Ester wurden die in Tab. 4-1 dargestellten Modellester synthetisiert, die wesentliche Strukturmerkmale der aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester repräsentieren (vgl. Strukturformel von BTA Abb. 3-3, Seite 12). Hierbei repräsentiert der Adipinsäure-

dibutylester 1 eine aliphatische Repetiereinheit, der Terephthalsäuredibutylester 2 eine aromatische Repetiereinheit der BTA-Copolyester.

Für Abbauuntersuchungen von Polyestern sind in der Literatur einige Hydrolasen, darunter hauptsächlich Lipasen (EC 3.1.1.3) beschrieben (Tab. 4-2). Lipasen (Triglycerol-Acylhydrolasen EC 3.1.1.3) sind in der Natur weitverbreitet. Sie kommen in Organen höherer Tiere (z.B. Pankreas), in Pflanzensäften (z.B. in Latex von Ficus-Arten) und Mikroorganismen (Bakterien, Hefen und Pilzen) vor. Bei Mikroorganismen treten Lipasen zumeist extrazellulär auf, wo sie Fette und Öle (Triglyceride) zu Glycerin und Fettsäuren (freien Fettsäuren, Diacylglyceride oder Monoacylglyceride) spalten [McCRAE und HAMMOND 1985].

Tab. 4-2: In der Literatur beschriebene Polyester-spaltende Enzyme

Enzym	hydrolysierte Polyester	Quelle
$\alpha$ -Chymotrypsin ( $\alpha$ -Chym)	Poly(lactid, Poly(lacid-co-phenyllactid)	TABUSHI et al. 1975
Hydrolase von <i>Comamonas acidovorans</i> TB-35	Poly(ester)urethan	AKUTSU et al. 1998
Lipase von <i>Aspergillus niger</i>	SP2/6, SP3/6, SP4/6  SP 2/6, SP 2/4, SP 4/4, SP 6/4  Polyester, Polyesterurethan, Polyestercarbonate, Polyesteramide	DARBY und KAPLAN 1968  POTTS et al. 1972  KOCH et al. 1998
Lipase AK	SP 4/4, Gummi/SP 4/4-Blend	KHAN et al. 1999
Lipase von <i>Candida antarctica</i>	Polyester, Polyesterurethan, Polyestercarbonate, Polyesteramide	KOCH et al. 1998
Lipase von <i>Candida cylindracea</i> (CcL) (= <i>Candida rugosa</i> )	SP 6/6, PCL, Poly(1,6-trimethylenadipat-co- caprolacton)  SP 2/6	TOKIWA et al. 1988  TOKIWA und SUZUKI 1977
Lipase von <i>Chromobacterium</i> <i>viscosum</i> (CvL)	Poly(1,2-trimethylenfumarat), Poly(1,2-trimethylenphthalat), Poly(1,2-trimethylenfumarat-co- phthalat)	VALIENTE et al. 1998
Lipase von <i>Mucor miehei</i>	Polyester, Polyesterurethan, Polyestercarbonate, Polyesteramide	KOCH et al. 1998
Proteinase K	PLLA des PLLA/Cellulose-Blend	NAGATA et al. 1998 a

Enzym	hydrolysierte Polyester	Quelle
Lipase von <i>Pseudomonas spezie</i> (PsL)	PCL des PCL/PLA-Blend  PCL  PVA (Abbau durch eine Mikroorganismen-Mischkultur)	GAN et al. 1999, SCHNABEL 1981  GAN et al. 1997  SAKAZAWA et al. 1981
Lipase von <i>Rhizopus delemar</i>	SP 3/4 SP2/6, SP4/6	WALTER et al. 1995 TOKIWA et al. 1990
Lipase von <i>Rhizopus arrhizus</i>	SP 2/6, SP 4/6 SP 6/6, PCL SP 2/6  Poly(caprolacton-co-lactam)	TOKIWA et al. 1990 TOKIWA et al. 1988 TOKIWA und SUZUKI 1977 NAKAYAMA et al. 1993
Lipase von <i>Thermomonospora fusca</i> (TfL)	Aliphatisch-aromatische BTA-Copolyester, Polyesteramid, PHB, SP 3/13, SP 4/4 („Bionolle“)	KLEEBOERG et al. 1998, KLEEBOERG 1999
PHB-Depolymerase von <i>Alcaligenes faecalis</i>	PHA-Copolyester  PHB	IWATA et al. 1999, ABE und DOI 1999  MUKAI et al. 1993 a
PHB-Depolymerase von <i>Aureobacterium anophage</i>	PHB	CANETTI et al. 1999
PHB-Depolymerase von <i>Pseudomonas lemoignei</i>	PHB	SPYROS et al. 1997
PHB-Depolymerase von <i>Pseudomonas stutzeri</i>	PHB	OHURA et al. 1999, MUKAI et al. 1994

Die in Tab. 4-2 aufgeführten Polyester-spaltenden Enzyme lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Während Lipasen (Triglycerol-Acylhydrolasen EC 3.1.1.3) lineare unverzweigte Polyester (z.B. PCL, SP 4/6) spalten, werden verzweigte Polyhydroxyalkanoate (z.B. Polyhydroxybuttersäure PHB) von speziellen PHB-Depolymerasen hydrolysiert. Einen umfassenden Überblick über extrazelluläre Polyhydroxyalkanoat-spaltende Depolymerasen gibt JENDROSSEK (1998).

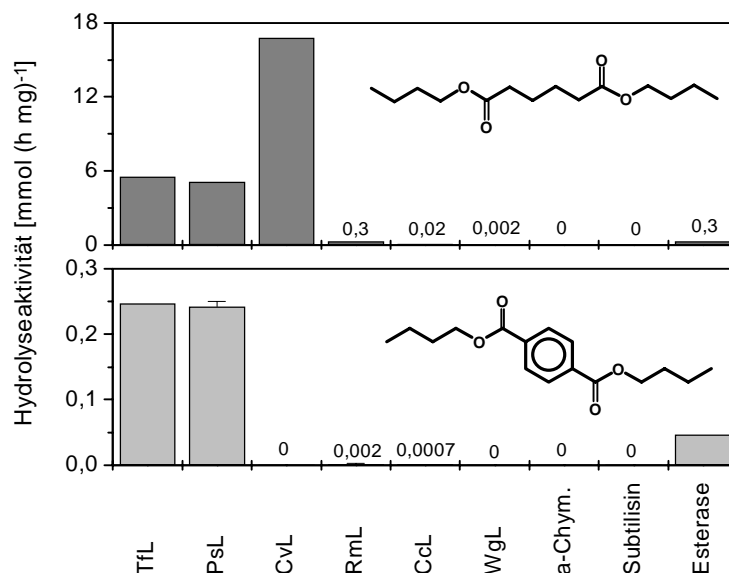
Zur Auswahl eines geeigneten Enzyms für den Enzymtest, wurden prokaryontische und eukaryontische Hydrolasen hinsichtlich ihrer Hydrolyseaktivität gegenüber den in Tab. 4-1 (Seite 15) gezeigten zwei niedermolekularen Modelleestern untersucht.

Von den sechs für das Enzymscreening eingesetzten Lipasen waren drei Lipasen bakterieller Herkunft (*Thermomonospora fusca* (TfL), *Pseudomonas spezie* (PsL), *Chromobacterium viscosum* (CvL)). Die anderen Lipasen waren pflanzlicher Herkunft (aus Weizenkeimen,

WgL) oder Isolate aus einem Pilz (*Rhizomucor miehei*, RmL) bzw. einer Hefe (*Candida cylindracea*, CcL) (Tab. 4-1). Zum Vergleich wurden zwei Proteasen (Peptid-Hydrolasen EC 3.4),  $\alpha$ -Chymotrypsin aus Rinderpankreas und Subtilisin aus *Bacillus subtilis*, sowie eine Esterase aus Schweineleber eingesetzt. Mit Ausnahme des Enzyms des thermophilen Aktinomyceten *T. fusca* waren alle Hydrolasen kommerziell verfügbar. Die Lipase des thermophilen Aktinomyceten konnte aufgrund einer Aminosäuresequenzanalyse den Serin-Hydrolasen zugeordnet werden und zeigte eine große Ähnlichkeit (65 %) zu der Triacylglycerol-Lipase von *Streptomyces albus* [KLEEBERG 1999].

Die zwei bei Raumtemperatur flüssigen Substrate Adipinsäuredibutylester 1 und Terephthalsäuredibutylester 2 (Struktur s. Tab. 4-1) wurden in einer Emulsionslösung im Titrationsversuch untersucht (Versuchsdurchführung s. Kapitel 6.8.1, Seite 142). Die bei der Esterhydrolyse freigesetzte Säure wurde unter Aufzeichnung des Laugenverbrauches neutralisiert. Eine Beispielkurve ist im Anhang dargestellt (Abb. 8-1). Alle Enzyme wurden ohne Berücksichtigung ihrer tatsächlichen Temperatur- oder pH-Optima bei 37°C und pH 7,0 vermessen, um vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten. In dem Konzentrationsbereich, in dem die Enzyme in den Abbautests verwendet wurden, bestand ein linearer Zusammenhang zwischen Enzymkonzentration und Aktivität, wie in Abb. 8-2 (Seite 163) im Anhang exemplarisch für die Lipase von *P. spezie*s mit Adipinsäuredibutylester 1 als Substrat gezeigt ist. So konnte aus den linearen Abbaukurven die jeweilige spezifische Enzymaktivität des umgesetzten Substrates ermittelt werden (Abb. 4-1).

Abb. 4-1:  
Enzymaktivitäten von  
verschiedenen Hydrolasen  
gegenüber zwei flüssigen  
Modellestern Adipinsäure-  
dibutylester 1 (oben) und  
Terephthalsäuredibutylester 2  
(unten) bei 37 °C.  
Zu beachten sind die unter-  
schiedlichen Skalierungen der  
Ordinaten.



Wie in Abb. 4-1 deutlich wird, hydrolysierten nur die drei bakteriellen Lipasen (TfL, CvL, PsL) den aliphatischen Modellester mit hohen spezifischen Enzymaktivitäten. Der aromatische



Modellester wurde nur von zwei der drei bakteriellen Lipasen gespalten, wobei die Abbauraten im Vergleich zu denen des aliphatischen Modellesters bis um den Faktor 25 geringer waren.

Interessanter Weise hydrolysierte die Lipase von *Chromobacterium viscosum* (CvL) den aromatischen Modellester nicht, obwohl sie die höchste spezifischen Aktivität gegenüber dem aliphatischen Diester aufwies. Aufgrund dieser Substratspezifität war diese Lipase ungeeignet, um generelle Aussagen zum Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur und der biologischen Abbaubarkeit von Polyestern zu erhalten.

Die Lipasen von *P. speziei* und *T. fusca* (PsL, TfL) spalteten sowohl Esterbindungen von aromatischen als auch von aliphatischen Säuren. Aufgrund der hohen spezifischen Aktivitäten gegenüber den niedermolekularen Modellestern erschienen diese zwei Enzyme für die Untersuchungen zur Struktur-Abbaubarkeits-Beziehung geeignet.

#### 4.1.2 Hydrolyse von polymeren Modellestern

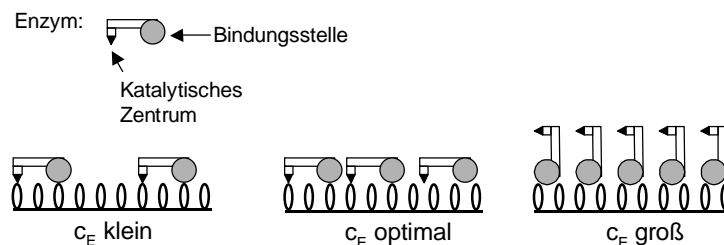
Es war zu prüfen, inwieweit die mit den Enzymen beobachteten Abbauergebnisse der niedermolekularen Modellester auf den Abbau von aliphatischen und aromatischen Polyestern übertragbar sind.

Da reine aromatische Polyester, wie z.B. Polyethylterephthalat und Polybutylterephthalat keinen meßbaren biologischen Angriff zeigen [YOSHIOKA et al. 1994, HEIDARY et al. 1994, HOPKINS 1993, EDGE et al. 1991], wurde der aliphatisch-aromatischer Copolyester (BTA 40:60) mit 40 mol-% Terephthalsäure eingesetzt. Als aliphatischer Polyester wurde der Homopolyester (SP 4/6) aus Adipinsäure und 1,4-Butandiol gewählt.

Mit Ausnahme der Lipase des thermophilen Aktinomyceten *T. fusca* (TfL) wurden alle Enzyme bei 37°C und pH 7,0 vermessen. Die Abbaukurven mittels TfL wurden bei höheren Reaktionstemperaturen aufgenommen und konnten aufgrund der geringen verfügbaren Enzymmenge nicht für 37 °C wiederholt werden. Dabei wurde der Homopolyester SP 4/6 mit einem Schmelzpunkt von 59 °C bei einer Meßtemperatur von 50 °C, der Copolyester BTA 40:60 ( $T_m = 105$  °C) bei 55 °C vermessen. Basierend auf der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität (s. Abb. 4-6 in Kapitel 4.1.3.2 sowie KLEEBERG 1999) wurden die bei 50 bzw. 55 °C gemessenen Werte zum besseren Vergleich auf eine Temperatur von 37 °C umgerechnet. Diese abgeschätzten Werte sind in Abb. 4-3 einbezogen (markiert mit: \*). Für diese Abschätzung ist zu beachten, daß ausschließlich das Temperaturverhalten der Lipase berücksichtigt wurde, nicht jedoch Veränderungen von Polymer-spezifischen Faktoren, wie beispielsweise die Beweglichkeit der Polymerketten und die Löslichkeit der Abbauprodukte, worauf an späterer Stelle eingegangen wird (s. Kapitel 4.4.1.2 ab Seite 53).

Im Gegensatz zu den flüssigen niedermolekularen Modelleestern wurde bei den aliphatischen Homopolyestern mit steigender Enzymkonzentration zunächst ein Anstieg der Abbauraten gemessen. Bei höheren Konzentrationen fiel die Abbaurate wieder ab. Dieser Effekt wird in Abb. 8-4 und Abb. 8-5 (Seite 164) am Abbau des aliphatischen Homopolyesters SP 4/6 deutlich. Ein solcher Zusammenhang wurde bislang nur für den natürlichen Polyester PHB mit PHB-Depolymerasen beschrieben [MUKAI et al. 1993 b, MUKAI et al. 1993 c, MUKAI et al. 1994]. Basierend auf der Beobachtung, daß PHB Depolymerasen (von *A. faecalis*, *P. picketti*, *C. testosteroni*) ein Aktivitätsmaximum aufweisen, wird folgendes mechanistische Modell beschrieben. PHB-Depolymerasen besitzen ein Adsorptionszentrum (= Bindungsstelle) und ein katalytisch aktives Zentrum (Abb. 4-2).

Abb. 4-2:  
Enzymatische Spaltung eines  
Makromoleküls nach  
DOI et al. (1994).



Oberhalb einer bestimmten Enzymkonzentration ( $c_E$  optimal), bei der die gesamte Polymeroberfläche optimal mit Enzym belegt ist, kommt es durch eine Behinderung der für die enzymatische Reaktion notwendigen Ausrichtung der Enzymmoleküle auf der Substratoberfläche zu einer Verringerung der Enzymaktivität, was möglicherweise auch die gemessene Maximumkurve für den synthetischen Polyester SP 4/6 begründet.

Für alle folgenden enzymatischen Abbauuntersuchungen mittels Lipase von *P. spezies* wurde die Proteinmenge eingesetzt, die eine maximale Hydrolyserate für SP 4/6 bei 37°C ergab (0,55 mg Protein, s. Pfeil in Abb. 8-4, Seite 164). Von den restlichen Lipasen wurden für die Abbauuntersuchungen der Polyesterfilme ähnliche Proteinmengen eingesetzt (0,5 mg). Von der vergleichsweise teuren Lipase von *C. viscosum* (CvL) und von der kommerziell nicht erhältlichen Lipase von *T. fusca* (TfL) wurden kleinere Enzymmengen von nur 0,05 mg Protein eingesetzt. Da der Zusammenhang zwischen der Hydrolyserate und der Enzymmenge nur für die Lipase von *P. spezies* untersucht wurde, können die in Abb. 4-3 angegebenen spezifischen Enzymaktivitäten gegenüber den Polymeren SP 4/6 und BTA 40:60 nur grobe Tendenzen anzeigen.

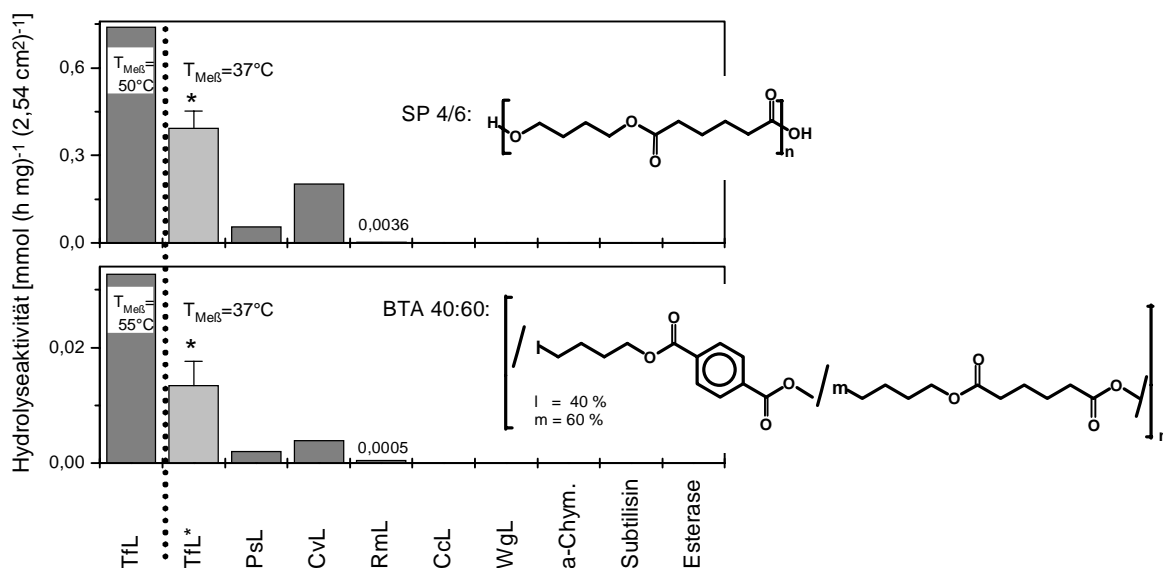


Abb. 4-3: Enzymaktivität verschiedener Hydrolasen gegenüber dem aliphatischen Homopolyester SP 4/6 (oben) bzw. dem aliphatisch-aromatischen Copolyester BTA 40:60 (unten) bei 37 °C.

Die thermophile Lipase TfL wurde nicht bei 37 °C, sondern bei höheren Meßtemperaturen vermessen (SP 4/6:  $T_{\text{Meß}} = 50\text{ °C}$  bzw. BTA 40:60:  $T_{\text{Meß}} = 55\text{ °C}$ ). Zur besseren Vergleichbarkeit aller Ergebnisse wurden die bei der erhöhten Temperatur gemessenen Aktivitäten in der Graphik durch eine gepunktete Linie optisch abgetrennt. Mit einem Stern (\*) markiert ist der unter Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität (Abb. 4-6) berechnete Wert für 37 °C angegeben. Zu beachten sind die unterschiedlichen Skalierungen der Ordinaten.

Der aliphatisch-aromatische Copolyester BTA 40:60 wurde langsamer als der aliphatische Homopolyester SP 4/6 hydrolysiert (Abb. 4-3). Gegenüber dem aliphatischen Homopolyester SP 4/6 zeigten nur die Lipasen eine Aktivität, die auch den niedermolekularen aliphatischen Modellester (Adipinsäuredibutylester 1) hydrolysierten (vgl. Abb. 4-1, Seite 18). Eine Ausnahme stellt die Esterase dar, die zwar die zwei monomeren Modellester (Abb. 4-1), nicht jedoch die Polyester SP 4/6 bzw. BTA 40:60 spaltete. Daraus läßt sich schließen, daß die Esterase nur wasserlösliche Anteile der niedermolekularen Modellester hydrolysierte, die wasserunlöslichen Polymeren jedoch nicht spalten konnte.

Nur Hydrolasen, die gegenüber dem Homopolyester SP 4/6 eine Aktivität zeigten, hydrolysierten auch den Copolyester BTA 40:60. Die Lipase von *Chromobacterium viscosum* (CvL), die bei den niedermolekularen Modellestern ausschließlich den aliphatischen Diester hydrolysierte (Abb. 4-1), spaltete von den Polymeren sowohl den aliphatischen Homopolyester SP 4/6 als auch den Copolyester BTA 40:60. Es liegt nahe, daß dieses Enzym ausschließlich die Adipatbindungen des Copolyesters hydrolysiert.

In dem Enzymscreening erwiesen sich die Lipase von *P. spezie*s (PsL) und von *T. fusca* (TfL) als geeignet, um Untersuchungen zur Klärung der Struktur-Abbaubarkeits-Beziehungen an Polyestern durchzuführen. Da das Enzym des thermophilen Aktinomyzeten (TfL) nur in sehr begrenzter Menge zur Verfügung stand (KLEEBERG reinigte 1999 nur 17 mg auf) wurde für die überwiegende Anzahl der Untersuchungen die kommerziell erhältliche Lipase von *P. spezie*s eingesetzt.

### 4.1.3 Charakterisierung der ausgewählten Lipasen

Die Enzyme von *P. spezie*s und *T. fusca* wurden zunächst hinsichtlich ihres pH- und Temperaturverhaltens charakterisiert und verglichen. Da die Lipase von *P. spezie*s in dieser Arbeit auch in Gegenwart des Lösungsmittels Dimethylformamid DMF eingesetzt werden sollte, war weiterhin zu klären, welchen Einfluß DMF auf die Lipaseaktivität hat.

#### 4.1.3.1 Einfluß des pH-Wertes auf die Enzymaktivität

Die Aktivität vieler Enzyme ist abhängig vom pH-Wert des umgebenen Mediums, wobei im allgemeinen eine Optimumskurve durchlaufen wird, deren Form durch zwei Effekte bestimmt wird: a) die direkte Mitwirkung ionischer Gruppen im aktiven Zentrum der Enzyme und b) die Beteiligung geladener Gruppen an der Aufrechterhaltung der nativen Proteinstruktur [BISSWANGER 1994].

Vergleichende Untersuchungen zur Struktur von Lipasen und PHA-Depolymerasen haben gezeigt, daß beide Enzymgruppen über eine ähnliche biochemische Struktur im aktiven Zentrum verfügen [JAEGER et al. 1995]. Im aktiven Zentrum von Lipasen und PHB-Depolymerasen befindet sich beispielsweise eine übereinstimmende Abfolge von Aminosäuren mit einem zentralen Serin-Rest, der nukleophil an den Estergruppen des Substrates angreift. Der Serin-Rest wird durch einen Histidin-Rest und einen Aspartat- (oder Glutamat-) Rest stabilisiert, wobei diese drei Aminosäure-Reste die sogenannte katalytische Triade des aktiven Zentrums von Esterasen bilden (Abb. 4-4).

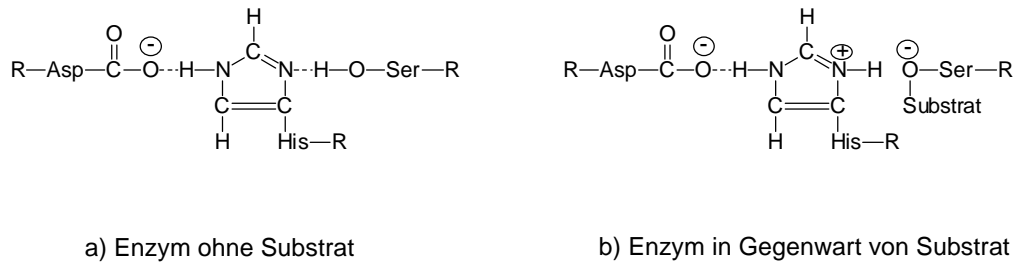


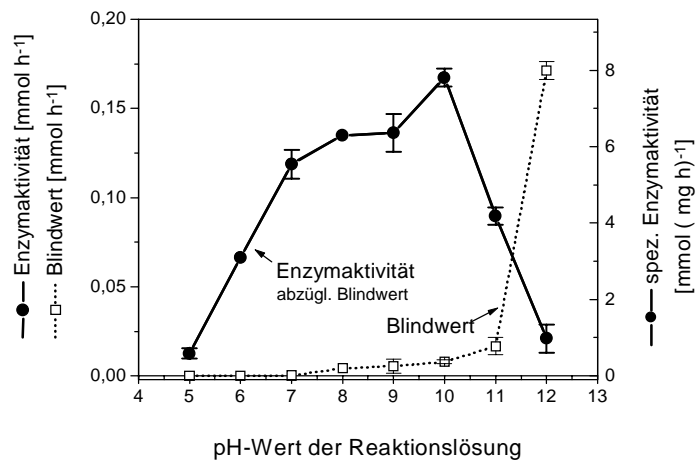
Abb. 4-4: Ionische Gruppe am Aspartat-Rest der katalytischen Triade [STRYER 1990].

Für die Hydrolyseaktivität der Lipase von *P. spezie*s wurde die in Abb. 4-5 (durchgezogene Linie) gezeigte Optimuskurve als Funktion des pH-Wertes ermittelt.

Abb. 4-5:

Enzymaktivität der Lipase von *P. spezie*s bei 37 °C in Abhängigkeit vom pH-Wert (Substrat: Adipinsäuredibutylester 1).

Die gestrichelte Linie gibt die in Abwesenheit des Enzyms gemessenen Blindwerte der rein chemischen Hydrolyse an, die zur Ermittlung der resultierenden Kurve (durchgezogene Linie) subtrahiert wurden.



Die gepunktete Linie in Abb. 4-5 zeigt die mit zunehmendem pH-Wert ansteigende rein chemische Hydrolyse des Substrates in Abwesenheit des Enzyms. Oberhalb von pH 11 lag die rein chemische Hydrolyse in der gleichen Größenordnung wie die enzymatische Hydrolyse.

Entgegen einer Glockenkurve zeigt die ermittelte Kurve für die pH-Anhängigkeit der Enzymaktivität (durchgezogene Linie) zwei Maxima (bei pH 8 und 10). Das unerwartete zweite Maximum bei pH 10 könnte auf eine starke rein chemische Hydrolyse zurückzuführen sein, die mit dem Blindwert nicht erfaßt wurde: Die Lipase von *P. spezie*s hydrolysierte 50 % der Esterbindungen des eingesetzten Modellesters (Adipinsäuredibutylester 1) (vgl. die enzymatische Abbaukurve in Abb. 4-11, Seite 31). Der gebildete säureterminierte Adipinsäuremonobutylester unterlag möglicherweise aufgrund seiner größeren Hydrophilie

einer stärkeren rein chemischen Hydrolyse, als der ursprüngliche Diester. Mit dem Blindwert (gestrichelte Linie in Abb. 4-5) wurde jedoch primär die chemische Hydrolyse des Diesters erfaßt. Bei pH 10 hydrolysierte das Spaltprodukt möglicherweise stärker, als der ursprüngliche Diester. So könnte das zweite Maximum bei pH 10 auf einen solchen Artefakt zurückzuführen sein. Folglich sollten Monoester besser als Diester geeignet sein, um pH-Einflüsse auf die Enzymaktivitäten zu untersuchen.

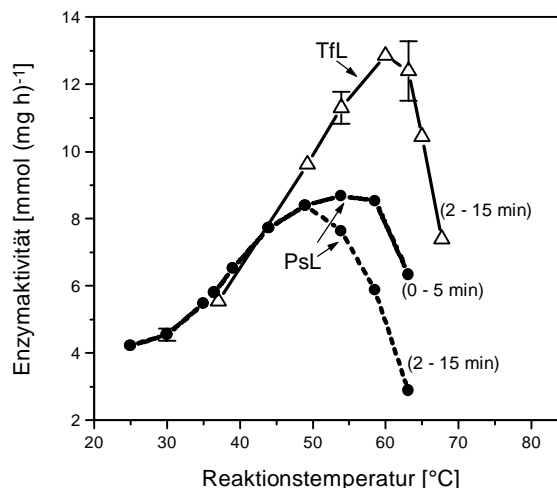
Für die Lipase von *T. fusca* ermittelte KLEEBERG (1999), mit einem BTA-Copolyester als Substrat, ein pH-Optimum von pH 6 bis 7. Mit sinkender Ionenstärke des Puffers verschob sich das Optimum von pH 6 zu pH 7.

Um den Einfluß der rein chemischen Hydrolyse bei den Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der chemischen Struktur von Polyestern und deren enzymatischen Hydrolyse möglichst gering zu halten, wurden die Abbauuntersuchungen der Polyesterfilmen bei einem stationären pH-Wert von 7,0 und einer einheitlichen Ionenstärke (0,9 % Kochsalzlösung) durchgeführt.

#### 4.1.3.2 Temperaturoptimum und -stabilität

Wie bei nicht katalysierten chemischen Reaktionen steigt auch die Geschwindigkeit enzymatischer Reaktionen mit der Temperatur an (im allgemeinen um einen Faktor von 2 – 3 pro 10 °C). Allerdings verzögert sich mit steigender Temperatur der Anstieg. Oberhalb einer charakteristischen Temperatur sinkt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder, was auf eine irreversible thermische Denaturierung der Proteinnatur des Enzyms zurückzuführen ist. Die Lage des Maximums ist abhängig von der Enzymstabilität.

Abb. 4-6:  
Enzymaktivitäten der Lipasen von *T. fusca* (TfL  $\Delta$ ) und *P. spezieis* (PsL  $\bullet$ ) in Abhängigkeit von der Meßtemperatur gemessen als Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten (Meßzeit: 2-15 min bzw. 0-5 min). Substrat: Adipinsäuredibutylester 1

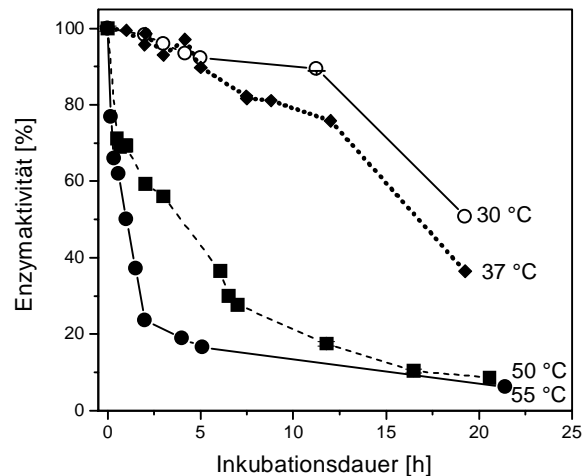


Die meisten Enzyme besitzen eine maximale Aktivität bei Temperaturen von 40 bis 50 °C [BISSWANGER 1979]. So zeigte auch die Lipase des mesophilen Bakteriums *P. spezie*s ein Maximum von 40 bis 50 °C, während die Lipase des thermophilen Aktinomyzeten *Thermomonospora fusca* bei 60 °C die höchste Hydrolyseaktivität aufwies (Abb. 4-6).

Die zwei in Abb. 4-6 für die Lipase von *P. spezie*s (PsL) dargestellten Kurven (schwarze Punkte) zeigen ein generelles Problem bei der Bestimmung des Temperaturverhaltens von Enzymen. Im Verlauf der Aktivitätsmessungen denaturiert das Enzym ständig. Die Lage des Maximums ist abhängig von dem Zeitintervall, in dem die Enzymaktivität bestimmt wird. Je länger dieses Intervall, d.h. die Meßzeit ist, desto mehr verschiebt sich das Maximum zu geringeren Temperaturen. Bei der thermophilen Lipase von *T. fusca* tritt die Enzymdenaturierung erwartungsgemäß erst bei höheren Temperaturen auf.

Im Hinblick auf die Durchführung der Enzymtests mit den Polyestern, die bis zu 20 Stunden dauern konnten, wurden die Enzymstabilitäten der Lipasen näher untersucht. Hierzu wurde die Lipase von *P. spezie*s bei vier verschiedenen Temperaturen (30 °C, 37 °C, 50 °C bzw. 55 °C) und die Lipase von *T. fusca* bei einer Temperatur von 55 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend die Enzymaktivität bei einer Meßtemperatur unterhalb des Temperaturmaximums (PsL bei 37 °C bzw. TfL bei 50 °C) bestimmt (Abb. 4-7).

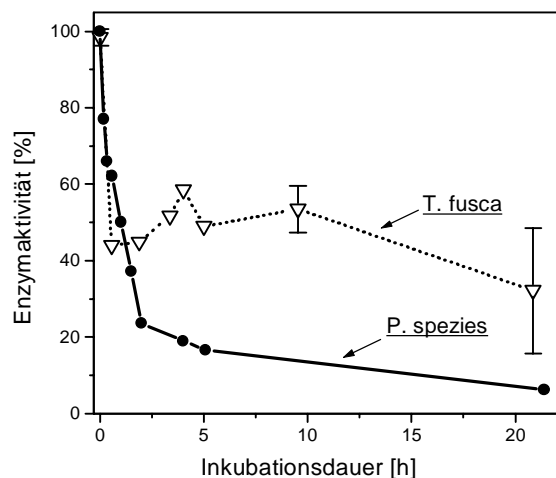
Abb. 4-7:  
Verringerung der Enzymaktivität der Lipase von *P. spezie*s unter Schütteln bei 900 U·min<sup>-1</sup> in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer bei verschiedenen Inkubationstemperaturen (30, 37, 50 bzw. 55 °C).  
Substrat: Adipinsäuredibutylester 1



Die Enzymaktivität von *P. spezie*s sank mit zunehmender Meßtemperatur und Inkubationszeit. Während bei 37 °C nach 12 Stunden noch 80 % der Anfangsaktivität vorlag, war die Aktivität zu diesem Zeitpunkt bei 50 °C bereits auf etwa 20 % gesunken.

Abb. 4-8 zeigt die zeitabhängigen Aktivitätsverluste bei der höchsten Inkubationstemperatur von 55 °C für die zwei Lipasen (TfL und PsL) im Vergleich.

Abb. 4-8:  
Enzymaktivität der Lipasen von  
*T. fusca* und von *P. spezie*s unter  
Schütteln (900 U·min<sup>-1</sup>) bei 55 °C als  
Funktion der Lagerungsdauer.  
Die Fehlerbalken ergaben sich aus  
Dreifachbestimmungen.  
Substrat: Adipinsäuredibutylester 1



Überraschender Weise halbierte sich die Aktivität der Lipase des thermophilen Aktinomyceten *T. fusca* (TfL) direkt nach dem Erwärmen der Probe. Dieser Aktivitätsverlust der TfL kann darauf zurückzuführen sein, daß diese Enzymlösung ohne stabilisierende Zusätze eingesetzt wurde. Demgegenüber war die kommerzielle Lipaselösung von *P. spezie*s gemäß Herstellerangaben mit Rinderserumalbumin (BSA), Natriumcholat, Zucker, Magnesiumchlorid und Kaliumphosphatpuffer stabilisiert.

Nach dem anfänglichen Verlust blieb die Aktivität der thermophilen Lipase (TfL) über mehrere Stunden konstant, während die Hydrolyseaktivität der mesophilen Lipase (PsL) ständig sank. Somit ist die Temperaturstabilität der thermophilen Lipase (TfL) erwartungsgemäß deutlich höher, als die der PsL.

Bezüglich des Temperaturoptimums läßt sich schlußfolgern, daß das in Abb. 4-6 für die zwei Enzyme ermittelte Temperaturmaximum nicht einer optimalen Temperatur für die enzymatischen Abbauuntersuchungen entspricht, da sich die Enzyme dort gerade nicht unter optimalen und stabilen Bedingungen befinden. Daher wurden beide Lipasen für die enzymatischen Abbauuntersuchungen bei Temperaturen eingesetzt, die etwa 10 °C unterhalb des jeweiligen Temperaturmaximums lagen. Die Untersuchungen mittels Lipase von *P. spezie*s wurden bei 37 °C und die mittels Lipase von *T. fusca* bei 50 °C durchgeführt.

#### 4.1.3.3 Lösungsmiteleinfluß auf die Enzymaktivität der PsL

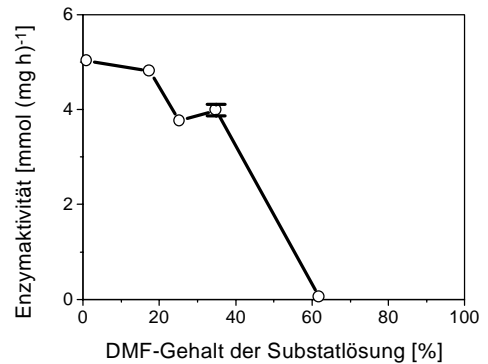
Um die Lipase von *P. spezie*s auch in Gegenwart des organischen Lösungsmittels Dimethylformamid (DMF) einsetzen zu können (s. Kapitel 4.4.1.2.2) war zu klären, wie sich die Enzymaktivität in Gegenwart dieses Lösungsmittels verändert. Dazu wurden



titrimetrische Aktivitätsbestimmungen mit dem aliphatischen niedermolekularen Modellester Adipinsäuredibutylester 1 bei unterschiedlichen Konzentrationen an DMF durchgeführt.

Abb. 4-9:

Verringerung der Enzymaktivität von *P. spezies* bei 37 °C gegenüber dem Modellester Adipinsäuredibutylester 1 mit zunehmendem Anteil des Lösungsmittels DMF. Der Fehlerbalken ergab sich aus einer Dreifachbestimmung.



Wie Abb. 4-9 zeigt sank die Enzymaktivität mit zunehmendem DMF-Gehalt. Bis zu einem DMF-Gehalt von 40 % war der Aktivitätsverlust relativ gering. Oberhalb von 40 % DMF fiel die Enzymaktivität schneller ab und sank bei 60 % DMF auf Null.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß von den untersuchten Hydrolasen zwei bakterielle Lipasen für den enzymatischen Abbautest geeignet waren. Die Lipase von *T. fusca* und *P. spezies* zeigten ausreichende Aktivitäten und thermische Stabilitäten für die geplanten Untersuchungen. Beide Enzyme hydrolysierten sowohl den aliphatischen, als auch den aromatischen niedermolekularen Ester (Adipinsäuredibutylester 1 bzw. Terephthalsäuredibutylester 2). Der aromatische Modellester 2 wurde von beiden Enzymen jedoch deutlich langsamer gespalten, als der aliphatische Ester 1.

## 4.2 Niedermolekulare Modellester

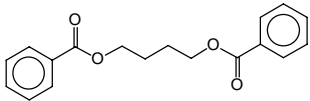
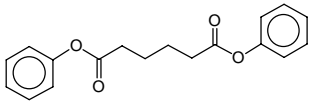
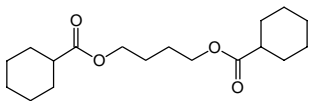
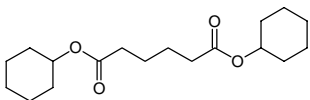
Um den enzymatischen Abbau unabhängig von polymerspezifischen Faktoren, wie Molmasse und Kristallinität untersuchen zu können, sind in der Literatur verschiedene Ansätze zu finden. Für Polyhydroxybuttersäure (PHB) gelang die Herstellung von Einkristallen, die eine direkte Bestimmung der Abbaugeschwindigkeit der Kristalle ermöglichte. Weiterhin wurden Abbauuntersuchungen an oligomeren und niedermolekularen Modellschubstanzen mit wesentlichen Strukturelementen von Polymeren durchgeführt [HOSOYA et al. 1978]. Auch in dieser Arbeit wurden neben den in Kapitel 4.1.1 vorgestellten Strukturen weitere niedermolekulare Modellester synthetisiert, die z.T. charakteristische Strukturmerkmale der aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester repräsentieren.

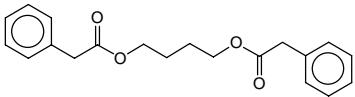
### 4.2.1 Cycloaliphatische und aromatische Diester

Die Untersuchungen zum enzymatischen Abbau der in Tab. 4-3 aufgeführten niedermolekularen cycloaliphatischen und aromatischen Diestern sollten folgende Fragen klären:

- Liegt bei Estern aromatischer Säuren eine sterische Hinderung bei dem nukleophilen Angriff des Carbonylkohlenstoffs der Estergruppen vor?
- Welchen Einfluß hat die Substratschmelztemperatur auf die enzymatischen Abbauraten?
- Wie beeinflussen unterschiedliche thermodynamische Bindungsstärken von Esterbindungen die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit?

Tab. 4-3: Charakteristische Daten von cycloaliphatischen und aromatischen niedermolekularen Modellestern.

Struktur	Name	M [g mol <sup>-1</sup> ]	T <sub>m</sub> [°C]	Sdp. [°C]
	1,4-Bis(benzoyloxy)- butan, <u>3</u>	298,34	80	-
	Adipinsäure- diphenylester, <u>4</u>	298,34	105	-
	1,4-Bis(cyclohexan- carbonyloxy)butan, <u>5</u>	310,43	33 <sup>a)</sup>	188 bei 2 mbar
	Adipinsäure- dicyclohexylester, <u>6</u>	310,43	41,4	-

Struktur	Name	M	T <sub>m</sub>	Sdp.
		[g mol <sup>-1</sup> ]	[°C]	[°C]
	1,4-Bis(phenylacetoxy)butan, <u>7</u>	326,39	47	-

a) Flüssig bei der Meßtemperatur (T<sub>Meß</sub> = 37 °C) der enzymatischen Abbauntersuchungen.

Aromatische Strukturbausteine liegen bei gleicher Molmasse sowohl in 1,4-Bis(benzoyloxy)butan 3 (= Benzoessäureester) als auch in Adipinsäurediphenylester 4 vor. Allerdings enthält der Benzoessäureester 3 eine aromatische Säure, der Adipinsäurediphenylester 4 hingegen einen aromatischen Alkohol. Analog zu den höheren Abbauraten des aliphatischen Adipinsäuredibutylesters in Kapitel 4.1.1 (ab Seite 15), sollten auch die Esterbindungen der aliphatischen Säure des Adipinsäurediphenylesters 4 mit höherer Geschwindigkeit gespalten werden, als die Esterbindungen der aromatischen Säure des Benzoessäureesters 3.

Wird die Abbaugeschwindigkeit jedoch, wie von TOKIWA und SUZUKI (1981) für den Abbau verschiedener Polyester postuliert, allgemein durch die Substratschmelzpunkte bestimmt, sollte gerade der Benzoessäureester 3 mit dem niedrigeren Schmelzpunkt schneller abgebaut werden, als der Adipinsäurediphenylester 4.

Als weiterer Parameter könnte eine sterische Hinderung am Carbonylkohlenstoff des Substrates die enzymatische Abbaugeschwindigkeit kontrollieren. Bei der enzymatischen Esterspaltung mittels Serin-Hydrolasen greift die Hydroxy-Gruppe des Serin-Restes nukleophil an der zu spaltenden Estergruppe an (s. Abb. 4-10, Teil a). Dabei wird das trigonale Substrat unter Annäherung der mit der Esterbindung verbundenen Struktureinheiten (Verringerung der Bindungswinkel von 120° auf 108°), in ein tetraedrisches Zwischenprodukt überführt (in Abb. 4-10, Teil b, exemplarisch für den Benzoessäureester 3 gezeigt) [DEREWENDA et al. 1994]. Möglicherweise wird die Ausbildung des tetraedrischen Zwischenproduktes durch die im Vergleich zu der Adipinsäure größere räumliche Ausdehnung des Benzolringes behindert. Im Vergleich zu dem planaren Benzolring des Benzoessäureesters 3 besitzt die in Sessel- oder Wannenkonformation vorliegende Cyclohexancarbonsäure des Esters 5 einen höheren Raumbedarf. Sofern die Geschwindigkeit der enzymatischen Esterhydrolyse durch den Raumbedarf der Säurekomponente kontrolliert wird, sollte der Benzoessäureester 3 schneller enzymatisch gespalten werden, als 1,4-Bis(cyclohexancarbonyloxy)butan 5.

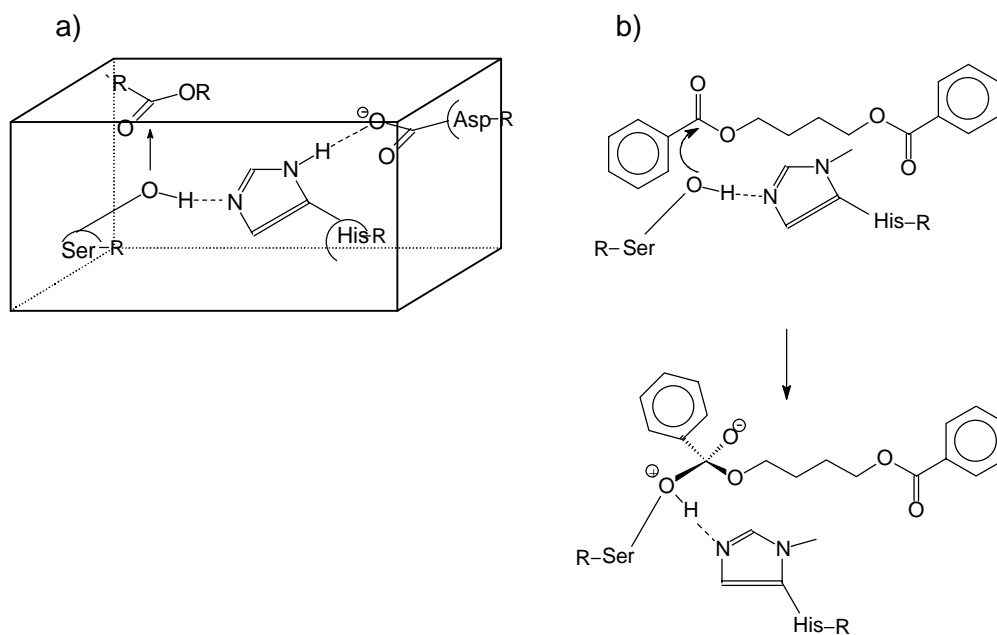


Abb. 4-10: a) Schema des Übergangszustandes bei der Spaltung von Triglyceriden an Lipasen [nach VASEL 1992]. Das aktive Zentrum des Enzyms wird von den Aminosäureresten Serin (Ser), Histidin (His) und Aspartat (Asp) gebildet.  
 b) Raumbedarf im tetraedrischen Übergangszustand: Aus dem trigonalen Substrat entsteht unter Annäherung der Substituenten ein tetraedrisches Addukt.

Die enzymatischen Abbauuntersuchungen wurden mit Ausnahme des Cyclohexancarbonsäureesters 5, der bei der Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}} = 37\text{ °C}$ ) flüssig vorlag, mit pulverförmigem Substrat (Partikelgröße: 0,2-0,3 mm) durchgeführt (Durchführung s. Kapitel 6.8.1.2, Seite 145). Der flüssige Modellester 5 wurde in einer Emulsionslösung vermessen (Durchführung s. Kapitel 6.8.1.1, Seite 144).

Die gemessenen enzymatischen Abbaukurven zeigt Abb. 4-11, wobei für den Benzoessäureester 3 exemplarisch eine Doppelbestimmung dargestellt ist.

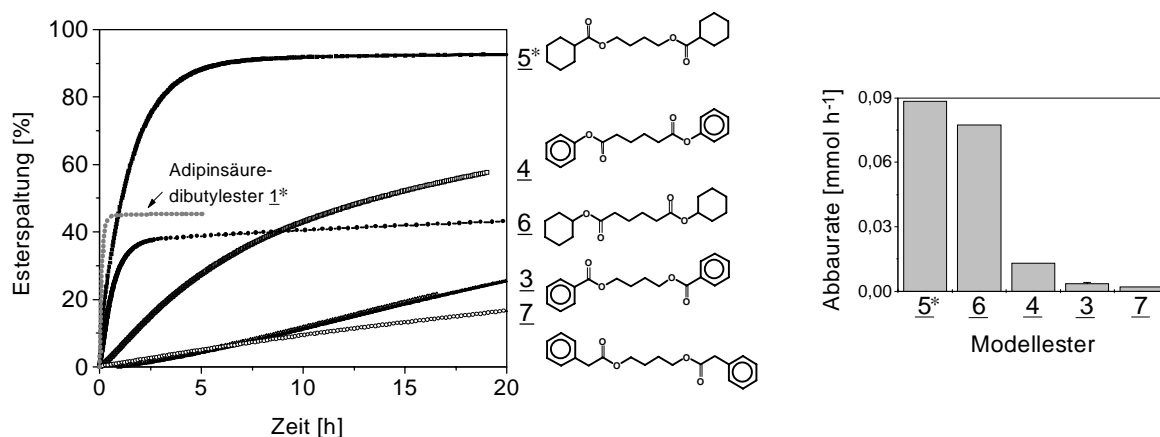


Abb. 4-11: Vergleich der niedermolekularen Modellester hinsichtlich ihrer Spaltungsgeschwindigkeit mittels Lipase von *P. spezieis* bei 37°C: enzymatische Abbaukurven (links) und aus den Anfangssteigungen der Abbaukurven ermittelte Abbauraten (rechts). Die Nummern beziehen sich auf die in Tab. 4-3 charakterisierten Modellester, wobei die als Flüssigkeiten eingesetzten Substrate 1 und 5 mit Sternen (\*) markiert sind. Zum Vergleich ist die Abbaukurve des bei 37 °C ebenfalls flüssigen aliphatischen Modellesters Adipinsäuredibutylester 1 gezeigt.

Alle gezeigten niedermolekularen Modellester wurden von der Lipase von *P. spezieis* hydrolysiert, wobei die Abbauraten deutlich variieren. Der Ester 5 mit der sterisch anspruchsvollen Cyclohexancarbonsäure wird deutlich schneller hydrolysiert, als alle anderen Verbindungen. Folglich scheinen sterische Effekte bei dem nukleophilen Angriff des Serin-Restes an der Carbonylgruppe nicht hauptsächlich für die unterschiedlichen enzymatischen Hydrolyseraten verantwortlich zu sein. Dementsprechend wird auch der Phenyllessigsäureester 7 (1,4-Bis(phenylacetoxymethyl)butan), trotz der zwischen Esterbindung und Phenylring vorhandenen Methylengruppe und der damit verbundenen geringeren sterischen Hinderung beim nukleophilen Angriff der Carbonylgruppe, nicht schneller hydrolysiert als der Benzoessäureester 3.

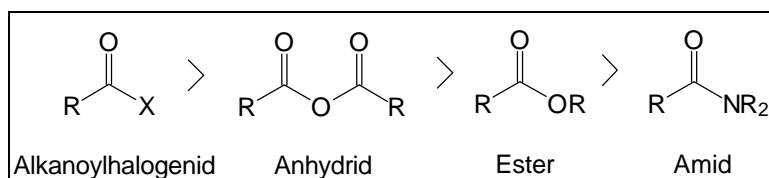
Auch der Schmelzpunkt stellt bei den untersuchten niedermolekularen Modellverbindungen nicht den entscheidenden Faktor für die Hydrolysegeschwindigkeit dar. So liegt bei dem Adipinsäurediphenylester 4 der Schmelzpunkt deutlich höher, als bei dem Benzoessäureesters 3. Trotz seines höheren Schmelzpunktes, wird der Adipinsäurediphenylester 4 schneller hydrolysiert.

Folglich liegt die Ursache für die langsame Hydrolyse der Ester von aromatischen Säuren weder in sterischen Effekten beim nukleophilen Angriff der Estergruppe durch die katalytische Triade der Lipase, noch in der Schmelztemperatur der Substrate begründet.

Als weitere Ursache für die langsamere enzymatische Hydrolyse der Esterbindungen aromatischer Säuren im Vergleich zu denen aliphatischer Säuren, soll die durch elektronische Effekte bestimmte thermodynamische Bindungsstabilität der Esterbindungen diskutiert werden. Ester gehen mit Nukleophilen (z.B. Wasser) Substitutionsreaktionen ein, die nach einem Additions-Eliminierungs-Mechanismus verlaufen [VOLLHARDT 1988]. Die relative Reaktivität verschiedener Carbonsäurederivate gegenüber Wasser nimmt mit zunehmender Elektronendichte am Carbonylkohlenstoff ab (Abb. 4-12).

Abb. 4-12:

Von links nach rechts  
abnehmende Reaktivität von  
Carbonsäure-Derivaten  
gegenüber Wasser  
[VOLLHARDT 1988].



Die mit dem Carbonylkohlenstoff verbundenen Substituenten (-X, -OCOR, -OR bzw. -NR<sub>2</sub>) sind in der Reihe von links nach rechts zunehmend in der Lage, dem durch die Carbonylgruppe ausgeübten Elektronenzug nachzugeben und damit die positive Teilladung am Carbonylkohlenstoff zu kompensieren. Diese Kompensation ist bei den Säureamiden am höchsten, wodurch deren Reaktivität gegenüber Nucleophilen am geringsten ist.

Auch Ester von aromatischen und aliphatischen Säuren unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Reaktivität gegenüber Wasser. Als Nucleophil greift das Wasser das unbesetzte Molekülorbital geringster Energie der Carbonylgruppe des Esters an (LUMO = lowest unoccupied molecular orbital). Bei Estern aromatischer Säuren, wie Benzoesäure oder Terephthalsäure, kommt es durch eine Elektronendelokalisation zu einer engergetischen Absenkung des LUMO der  $\pi$  C=O-Bindungen (Abb. 8-3 auf Seite 163 zeigt die energetische Absenkung des LUMO der C=C Bindung von 1,3-Butadien im Vergleich zu Ethen). Durch diese Absenkung der Elektronendichte am Carbonyl-Kohlenstoff sind Ester aromatischer Säuren bei landungskontrollierten Reaktionen leichter nucleophil angreifbar, als Ester von aliphatischen oder cycloaliphatischen Säuren.

Demgegenüber zeigen die Abbauergebnisse der niedermolekularen Ester (Adipinsäuredibutylester 1 und Terephthalsäuredibutylesters 2) jedoch gerade für den Terephthalsäureester 2 eine geringer Hydrolysegeschwindigkeit (vgl. Abb. 4-1, Seite 18). Die enzymatische Hydrolyse der Esterbindungen erfolgt somit nicht landungskontrolliert, Unterschiede in den Ladungsdichten haben keinen Einfluß auf die enzymatischen Abbaugeschwindigkeiten.

Als weiterer Grund für die Unterschiede in den enzymatischen Hydrolyseraten, ist eine Inhibierung der katalytischen Enzymwirkung denkbar, die in Folge einer Anreicherung von Abbauprodukten an der Materialoberfläche auftreten könnte. Da die Alkoholkomponenten der Modellester jedoch in Wasser unbegrenzt löslich sind, ist bezüglich der alkoholischen Spaltprodukte keine Inhibierung durch thermodynamische Löslichkeitsbegrenzung zu erwarten. Auch durch die unter den Randbedingungen der enzymatischen Abbauuntersuchungen als Salze vorliegenden Säuren ist aufgrund deren guter Löslichkeit (vgl. Löslichkeit der Säure und des Natriumsalzes der Benzoesäure in Abb. 8-1, Seite 163) keine Beschränkung der Abbaugeschwindigkeit durch Überschreiten von thermodynamischen Löslichkeitsgrenzen zu erwarten.

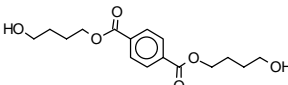
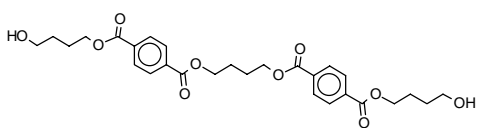
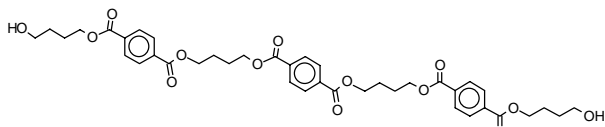
#### 4.2.2 Aromatische Oligoester

Aus den oben beschriebenen Abbauuntersuchungen der verschiedenen Diestern konnte zwar die Rolle verschiedener Parameter bezüglich des enzymatischen Abbaus von aliphatischen und aromatischen Polyestern spezifiziert werden. Die Frage, warum aromatischen Polyester enzymatisch nicht angreifbar sind, blieb jedoch zunächst unbeantwortet.

Aus diesem Grund sollen im Folgenden nicht nur Diesterstrukturen, sondern auch längere oligomere Sequenzen, wie sie in aromatischen Homopolyestern und aliphatisch-aromatischen Copolyestern vorliegen, hinsichtlich ihrer enzymatischen Hydrolyse untersucht werden. Hierzu wurden aus einem Oligomergemisch (kondensiert aus 1,4-Butandiol und Terephthalsäure) mittels Fraktionierung in unterschiedlichen Lösemitteln definierte, alkoholterminierte aromatische Estersequenzen mit ein, zwei oder drei Wiederholungseinheiten des Polybutylenterephthalates (PBT) isoliert (Tab. 4-4).

Für die enzymatischen Abbauuntersuchungen mittels Lipase von *P. spezie*s wurden die aromatische Zweier- bzw. Dreier-Sequenz in Form von Feststoffpulvern (Partikeldurchmesser: 0,2 bis 0,3 mm) eingesetzt. Die aromatische Einer-Sequenz war unter den Randbedingungen der enzymatischen Abbauuntersuchungen bei 50 °C vollständig löslich. Die ermittelten enzymatischen Abbaukurven zeigt Abb. 4-13.

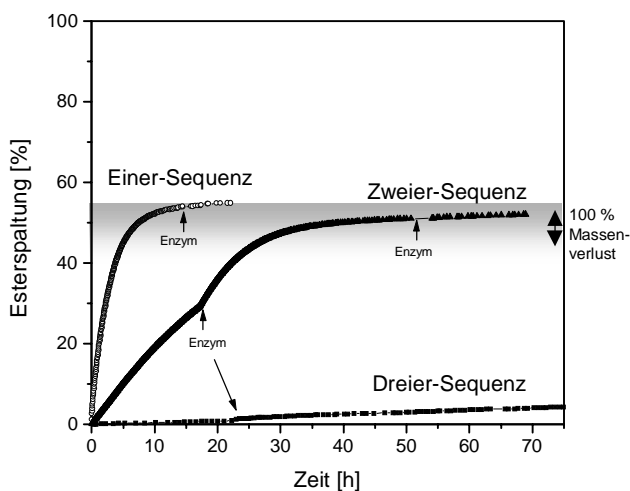
Tab. 4-4: DSC-Meßdaten (Schmelzpunkt  $T_m$  und Schmelzenthalpie  $\Delta H_m$ ) und Lösungsseigenschaften von alkoholterminierten aromatischen Oligoestern mit bis zu 3 aromatischen Repetiereinheiten.

Bez.	Struktur	löslich in		
		H <sub>2</sub> O	MeOH	DMF
Einer-Sequenz	 $M = 310,3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $T_m = 75 \text{ }^\circ\text{C}; \Delta H_m = 39,7 \text{ kJ mol}^{-1}$	+ <sup>a)</sup>	+	+
Zweier-Sequenz	 $M = 530,6 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $T_m = 129 \text{ }^\circ\text{C}; \Delta H_m = 54,1 \text{ kJ mol}^{-1}$	-	+	+
Dreier-Sequenz	 $M = 750,8 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ $T_m = 165 \text{ }^\circ\text{C}; \Delta H_m = 81,1 \text{ kJ mol}^{-1}$	-	-	+

a) Die temperaturabhängige Löslichkeit der aromatischen Einer-Sequenz in Wasser zeigt Abb. 8-6, Seite 165.

Abb. 4-13:

Verringerung der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit von alkoholterminierten, aromatischen Oligoestern mit zunehmender Oligomerlänge mittels Lipase von *P. spezieis* bei 50 °C. Die Pfeile geben den Zeitpunkt einer erneuten Enzymzugabe an.



Bei der Einer- und Zweier-Sequenz wird nach der Spaltung von 50 % der vorhandenen Esterbindungen eine extreme Verringerung der Hydrolysegeschwindigkeit beobachtet (bei



der Dreier-Sequenz war aufgrund der deutlich langsameren Hydrolyse ein solches Plateau innerhalb des Meßzeitraumes nicht zu detektieren). Diese Verringerung der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit vor Erreichen der 100 %-igen Esterspaltung wurde auch für den enzymatischen Abbau von Polyestern beschrieben [PETERS 1995, KLEIN 1996, s. auch Abb. 4-35, Seite 59]. Das Erreichen der Plateaus kann darauf zurückgeführt werden, daß die Lipase von *P. spezieis* wasserlösliche Abbauprodukte (= häufig niedermolekulare Ester, die aufgrund der Reaktionsbedingungen als polare Salze vorliegen) nicht mehr weiter spalten kann. Im Gegensatz zu den salzförmigen Spaltprodukten wurde die ebenfalls wasserlösliche aromatische Einer-Sequenz jedoch von der Lipase gespalten. Dieser aromatische alkoholterminierte Oligoester lag allerdings nicht als Salz vor und wurde offenbar aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften von der Lipase hydrolysiert.

Für die Einer-Sequenz könnte die gemessene 50 %-ige Spaltung dadurch erklärt werden, daß bei einer primären enzymatischen Hydrolyse zunächst 1,4-Butandiol und ein löslicher BT-Monoester (Terephthalsäuremonobutylester) entstehen (Abb. 4-14). Der unter den Versuchsbedingungen als wasserlösliches Natriumsalz vorliegende BT-Ester wurde nicht oder deutlich langsamer enzymatisch gespalten, als das Edukt (Einer-Sequenz).

Die Esterbindungen der aromatischen Zweier-Sequenz wurden ebenfalls zu 50 % gespalten. Als Abbauprodukte lassen sich je Mol Substrat zwei Mol BT-Monoester und ein Mol 1,4-Butandiol (vgl. Abb. 4-14) oder aber unter der Annahme, daß eine BT Sequenz nicht weiter hydrolysiert werden kann, zwei Mol 1,4-Butandiol und ein Mol TBT-Diester postulieren.

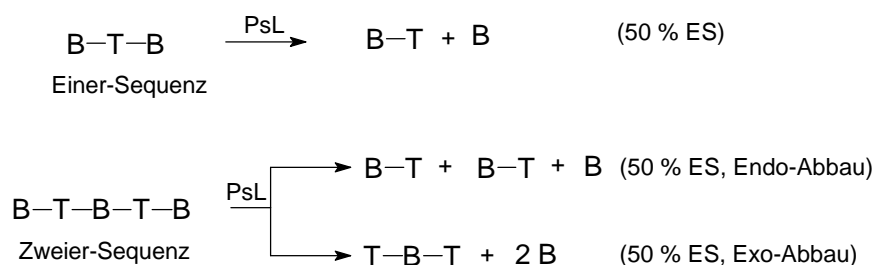


Abb. 4-14: Mögliche Abbaumechanismen der aus Terephthalsäure (T) und 1,4-Butandiol (B) aufgebauten aromatischen Einer- bzw. Zweier-Sequenz.

Die Abbauergebnisse der aromatischen Oligoester werfen zwei grundsätzliche Fragen auf:

- Aus welchem Grund sinkt die Hydrolysegeschwindigkeit mit zunehmender Sequenzlänge?
- Ist bei aromatischen Oligoestern ein Endo-Abbau, d.h. eine Kettenspaltung zwischen zwei Terephthalsäuremolekülen prinzipiell möglich?

Die Fragen sollen anhand der räumlichen Verhältnisse im Bereich des katalytischen Zentrums der Lipase diskutiert werden. Über den Mechanismus der Substratbindung bei Triacylglycerol-Lipasen mußte in der Vergangenheit spekuliert werden. Erst nach der Strukturaufklärung von Lipasen, besonders nach der erfolgreichen Cokristallisation von Lipasen mit substratanalogen Verbindungen (z.B. Phosphonaten), stand mit der molekularen Struktur ein Ausgangsmodell für die Erklärung der Substratbindung zur Verfügung [VERGER et al. 1969]. Die Arbeiten beschrieben den Aktivierungsprozeß der lipolytischen Enzyme. Der als „Interfacial Catalysis“ beschriebene Vorgang erfordert die Umorientierung der Molekülstruktur des Enzyms. Die Notwendigkeit eines solchen Mechanismus wurde damit erklärt, daß bei der Bereitstellung der vollständigen Bindungsstelle für ein Triglycerid normaler Größe (z.B. mit Palmitinsäureestern) die Lipase selbst über einen großen hydrophoben Bereich an ihrer Oberfläche verfügen müßte [VERGER et al. 1973].

Damit die dadurch entstehenden Probleme bei der Löslichkeit der Lipase in einer wäßrigen Umgebung möglichst klein bleiben, sollte erst bei Kontakt der Lipase mit dem Substrat die hydrophobe Umgebung des aktiven Zentrums freigelegt werden. Das aktive Zentrum von Lipasen befindet sich unter Teilen eines aus hydrophoben Seitenketten gebildeten Peptidgerüsts verborgen. Diese Peptidstrukturen bilden einen sogenannten Deckel (engl. lid), der vor dem Eindringen des Substrates durch Konformationsänderungen bewegt werden muß [SCHRAG et al. 1991]. Erst danach ist das aktive Zentrum mit seiner katalytischen Triade für das Substrat zugänglich.

Bezüglich der Substratspezifität lassen sich Lipasen in drei Gruppen teilen. Die erste Gruppe umfaßt Lipasen ohne Positionselektivität, d.h. sie spalten Triglyceride an allen drei Esterbindungspositionen (z.B. Lipase aus *Staphylococcus aureus*, *Corynebacterium acnes* und *Candida cylindracea*).

Die zweite Gruppe umfaßt Lipasen mit 1,3-Positionselektivität. Sie spalten nur die Fettsäuren der primären Alkoholgruppen des Glycerins, zumindest bei nicht allzu langer Einwirkzeit (z.B. Lipase von *Aspergillus*, *Mucor* und *Rhizopus*).

Die dritte Gruppe umfaßt Lipasen mit einer hohen Fettsäurespezifität. So spaltet z.B. die Lipase aus *Geotrichium candidum* bevorzugt Fettsäuren, die in der C9-Position eine cis-Doppelbindung besitzt.

Die Lipase aus *Rhizomucor miehei* (RmL) hydrolysierte das Triglycerid einer mehrfach

ungesättigten Fettsäure im Gegensatz zu Triglyceriden mit gesättigten Fettsäuren nicht [LANGHOLZ et al. 1989]. VASEL (1992) führte diese Selektivität auf die Doppelbindungen des Substrates zurück, die die Substratkette in der Nähe der zu spaltenden Esterbindungen versteifen und somit das erfolgreiche Einpassen des Substrates in das aktive Zentrum der Lipase verhindern.

Analog werden auch die Ergebnisse der enzymatischen Abbauuntersuchungen der aromatischen Oligomere unter dem Aspekt der Kettensteifigkeit diskutiert. Leider lag für die in dieser Arbeit hauptsächlich eingesetzt Lipase (*Pseudomonas spezies*) keine Angabe bezüglich der genauen Spezies vor. Die bislang in der Literatur beschriebenen Lipasen der Familie der *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas cepacia*, PcL und *Pseudomonas glumae*, PgL) wiesen jedoch eine sehr hohe Identität in der Proteinstruktur von 84 % auf [SCHRAG et al. 1997]. Auf der Grundlage der Röntgenstrukturdaten der Lipase von *Pseudomonas cepacia* wird im folgenden der Einfluß der Substratstruktur auf die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit diskutiert.

Der lipolytischen Substratspaltung muß eine Konformationsänderung der Lipase vorausgehen, die darin besteht, daß der Deckel (Lid) oberhalb des aktiven Zentrums durch eine Konformationsänderung geöffnet wird. Durch Kristallisation in Gegenwart von 50 % n-Propanol gelangen SCHRAG et al. (1997) die röntgenkristallographische Bestimmung der geöffneten Struktur der Lipase von *Pseudomonas cepacia* (PcL), die in Abb. 4-15 gezeigt ist. Das aktive Zentrum liegt im Innern des Proteins, etwa in der Mitte der Enzymstruktur.

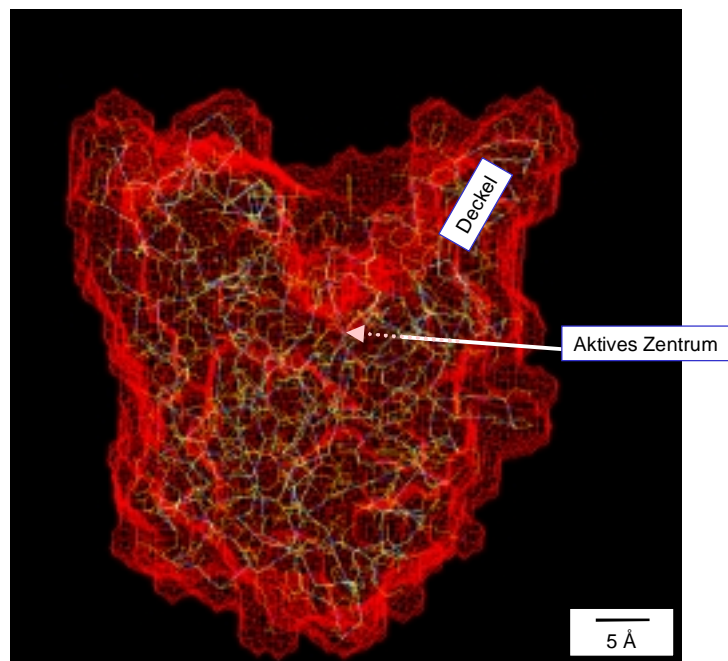


Abb. 4-15:

Geöffnet Struktur der Lipase von *Pseudomonas cepacia* (PcL) [nach SCHRAG et al. 1997].

Um Hinweise auf die Position von Substraten am aktiven Zentrum zu erhalten, untersuchte CYGLER et al. (1994) die Struktur der Lipase von *Candida cylindracea* (= *Candida rugosa*). Die Aufklärung der Röntgenstruktur erfolgte in Gegenwart des substratanalogen Inhibitors (1R)-Methylhexylphosphonat.

Die von CYGLER et al. bestimmte Position des Inhibitors bei der Lipase von *Candida cylindracea* wurde empirisch auf die zuvor beschriebene geöffnete Struktur der Lipase von *Pseudomonas cepacia* übertragen (vgl. Lage des Inhibitors in der folgenden Abb. 4-16). Der Inhibitor ist in der Darstellung so ausgerichtet, daß die Phosphonatgruppe (P-Atom: violett, O-Atome: rot, C-Atome: grau markiert) nahe des Serin-Restes der katalytischen Triade liegt.

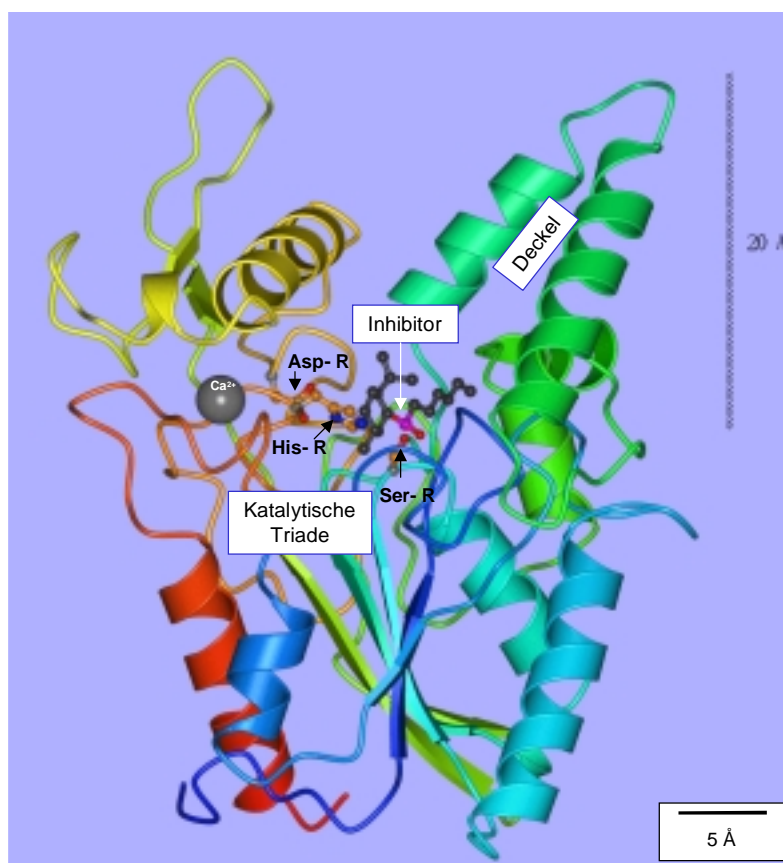
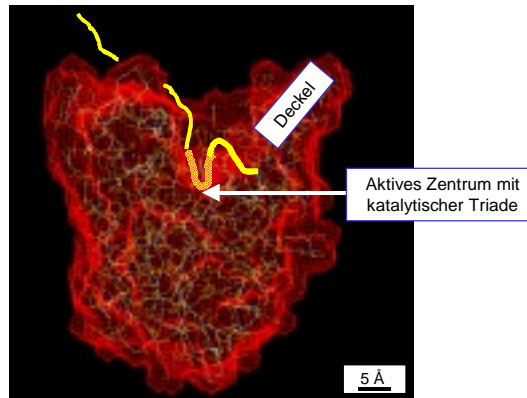


Abb. 4-16: Geöffnet Struktur der Lipase von *Pseudomonas cepacia* (PcL) [nach SCHRAG et al. 1997]. In dem aktiven Zentrum befindet sich der substratanaloge Inhibitor (1R)-Methylhexylphosphonat. Die Position des Inhibitors ist aus den experimentell ermittelten Daten für die Lipase von *Candida cylindracea* abgeleitet [CYGLER et al. (1994)].

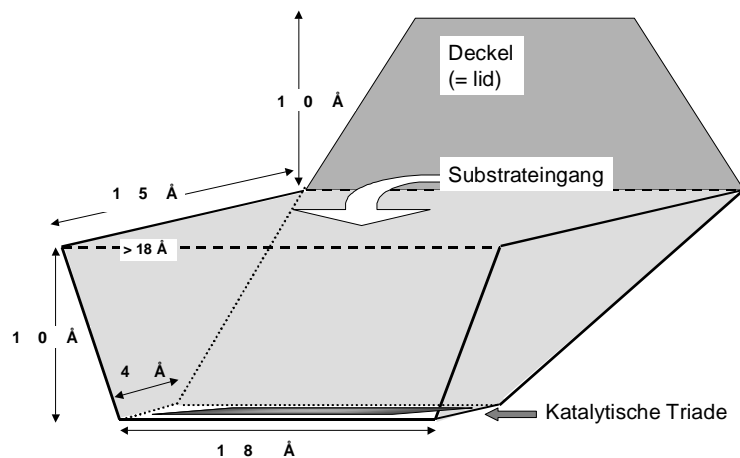
Das aktive Zentrum befindet sich somit in einer trogförmigen Vertiefung, was in der folgenden Abbildung Abb. 4-17 schematisch für die Lipase von *Pseudomonas cepacia* gezeigt ist.

Abb. 4-18:  
Schematischer Einbau einer Polymerkette (gelb) in den trogförmigen Zugangsbereich des aktiven Zentrums der Lipase von *Pseudomonas cepacia*.



Im Vergleich zu Abb. 4-16 und Abb. 4-19 ist die trogförmige Vertiefung in Abb. 4-20 um die vertikale Achse gedreht (45 ° gegen den Uhrzeigersinn). Nun befindet sich der Deckel nicht mehr rechts von dem Substrateingang, sondern hinter der Vertiefung.

Abb. 4-20:  
Schematische Darstellung des trogförmigen Zugangsbereiches des aktiven Zentrums der Lipase von *Pseudomonas cepacia*.

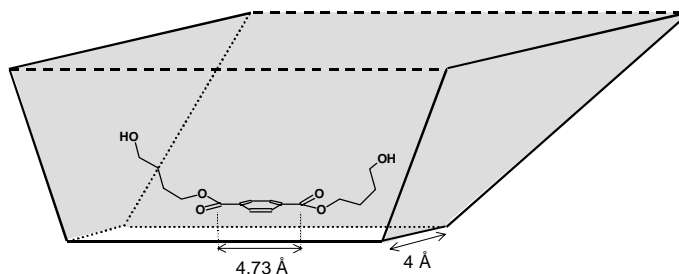


Durch Öffnung des Lids entsteht ein trogförmiger Zugangsbereich, an dessen Boden sich die katalytische Triade befindet. Mit zunehmender Tiefe verengt sich der Zugangsbereich bis am aktiven Zentrum nur noch eine Breite von ca. 4 Å für das Substrat zugänglich ist. Die Tiefe des Zugangsbereiches setzt voraus, daß die Substratketten eine Schlaufe („Loop“) hinreichender Länge bilden.

Abb. 4-21 zeigt den schematischen Einbau der aromatischen Einer-Sequenz in den als „Sackgasse“ endenden trogförmigen Zugangsbereich zum aktiven Zentrum der Lipase von *Pseudomonas cepacia*.

Abb. 4-21:

Schematischer Einbau der aromatischen Einer-Sequenz in den trogförmigen Bereich vor dem aktiven Zentrum der Lipase von *Pseudomonas cepacia*



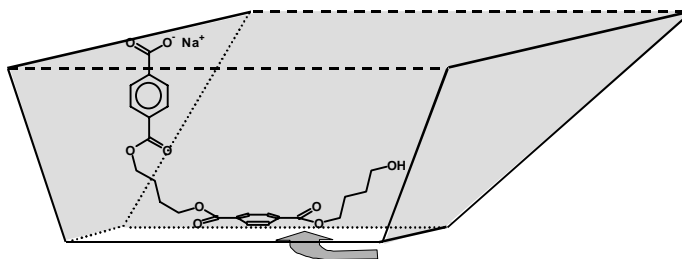
Der nach Abspaltung eines Butandiolrestes entstehende Monoester wird nicht weitergespalten, was aus dem prozentualen Anteil der gespaltenen Esterbindungen zu schließen ist (50 % Esterspaltung, Abb. 4-13, Seite 33). Der durch die 50 %-ige Spaltung entstehende Monoester BT besitzt einen Hydroxylrest und einen Säurerest, der unter den Randbedingungen der enzymatischen Abbauuntersuchungen (Titration der entstehenden Säuregruppen mittels Natronlauge) in das Natriumsalz überführt wird. Aufgrund seiner Hydrophilie kann das entstehende Salz offenbar keine erneute Öffnung des Lids bewirken, was den 50 %-igen Abbaugrad erklärt.

In der aromatischen Zweier-Sequenz können zwei Gruppen von Esterbindungen unterschieden werden (Struktur vgl. Tab. 4-4, Seite 34): Die äußeren Estergruppen der endständigen Butandiolreste und die inneren Estergruppen, die mit dem zentralen Butandiol verbunden sind. Im Bereich der endständigen Butandiolreste sollte die Kette beweglicher sein, als im Bereich der inneren Estergruppen. Sofern die höhere Kettenbeweglichkeit den Einbau der Kette in das aktive Zentrum begünstigt, sollten primär die äußeren Estergruppen in dem aktiven Zentrum gespalten werden (vgl. Endo-Abbaumechanismus von BTBTB in Abb. 4-14, Seite 35).

Das nach der Abspaltung eines Butandiolrestes entstehende Natriumsalz BTBT ist aufgrund der zwei Terephthalsäuremoleküle (T) hydrophober, als der nach Spaltung der aromatischen Einer-Sequenz gebildete Monoester BT. Die gemessene prozentuale Esterspaltung von 50 % (vgl. Abb. 4-13, Seite 34) zeigt, daß das BTBT trotz seines Salzrestes weiter gespalten wurde. Den Einbau dieses Zwischenproduktes in den trogförmigen Zugangsbereich zeigt Abb. 4-22.

Abb. 4-22:

Schematischer Einbau der aromatischen Zweier-Sequenz (nach Abspaltung eines Butandiolrestes) in den Zugangsbereich zum aktiven Zentrum der Pcl.

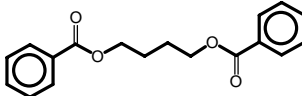
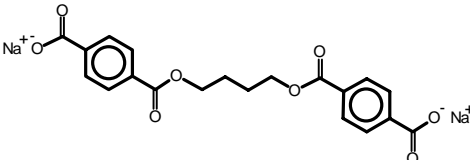


Durch die enzymatische Abspaltung des zweiten 1,4-Butandiol-Restes entsteht das Dinatriumsalz TBT (Struktur s. Tab. 4-5), was einer 50 %-igen Esterspaltung entspricht, die auch tatsächlich gemessen wurde (Abb. 4-13, Seite 34). Auch chromatographische Untersuchungen der wasserlöslichen Abbauprodukte nach dem enzymatischen Abbau der aromatischen Zweier-Sequenz mittels Lipase von *P. spezieis* bei 37 °C lassen auf das Dinatriumsalz TBT als Abbauprodukt schließen [WALTER 1999]. Als Ursache dafür, daß das Dinatriumsalz TBT von der Lipase von *P. spezieis* nicht weiter gespalten wurde, kommen zwei Erklärungen in Betracht:

- Das als Salz vorliegenden TBT wird aufgrund seiner erhöhten Hydrophilie von der Lipase nicht als Substrat erkannt. Der Deckel (lid) bleibt geschlossen.
- Die Substratkette ist zwischen zwei Terephthalsäuremolekülen nicht ausreichend flexibel, um die für die enzymatische Spaltung erforderliche Ausrichtung der Esterbindung am aktiven Zentrums zu ermöglichen.

Der Überlegung, daß die Lipase von *P. spezieis* Estergruppen innerhalb aromatischer Sequenzen nicht spalten kann, steht jedoch zunächst der gemessene enzymatische Abbau des niedermolekularen Modellesters 1,4-Bis(benzoyloxy)butan 3 gegenüber (Vergleich der Strukturen s. Tab. 4-5).

Tab. 4-5: Vergleich zweier Strukturen mit aromatischen Säuren.

Bezeichnung	Struktur
Modelldiester <u>3</u> 1,4-Bis(benzoyloxy)butan	
Abbauprodukt TBT der aromatischen Zweier-Sequenz	

Der enzymatisch spaltbare Modellester 1,4-Bis(benzoyloxy)butan 3 unterscheidet sich jedoch in zwei Merkmalen von dem resistenten Abbauprodukt TBT:

1. Der Modellester 3 ist im Vergleich zu dem salzförmigen Abbauprodukt der aromatischen Zweiersequenz hydrophober, wodurch er von der Lipase eher als Substrat „erkannt“ wird.

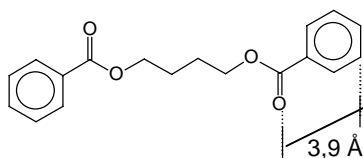
2. Die starre Moleküleinheit des Modellesters 3 ist um 20 % kürzer, als die des TBT (vgl. Abb. 4-23). Je kürzer der starre und somit nicht knickbare Kettenbereich ist, desto leichter läßt sich die Substratkette vermutlich in das aktive Zentrum der Lipase einpassen.

Auch bei dem Adipinsäurediphenylester 4, dessen Struktur Abb. 4-23 im Vergleich zu der Struktur des zuvor diskutierten 1,4-Bis(benzoyloxy)butan 3 zeigt, wurde an Esterbindungen zwischen zwei aromatischen Ringen gespalten (Abbaukurve s. Abb. 4-11, Seite 31).

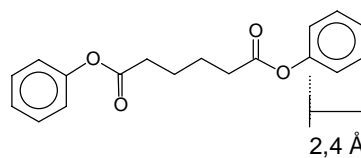
Abb. 4-23:

Strukturvergleich  
zweier aromatischer  
Modelldiester.

1,4-Bis(benzoyloxy)butan, 3



Adipinsäurediphenylester, 4



Adipinsäurediphenylesters 4 weist im Vergleich zu dem Benzoesäureester 3 sogar einen noch kürzeren unflexiblen Kettenbereich auf, was den deutlich schnelleren enzymatischen Abbau von 4 erklären könnte.

Die Ergebnisse der enzymatischen Abbauuntersuchungen an den aromatischen Modellverbindungen zeigen, daß Lipase-Substrate drei Anforderungen erfüllen müssen:

1. Das Substrat muß hinreichend lipophil sein, um die zur Öffnung des Deckels erforderliche konformative Änderung der Lipasestruktur zu bewirken.
2. Die Spaltung der Esterbindungen findet ca. 20 Å unterhalb der Enzymoberfläche statt. Folglich müssen die Polymerketten zumindest teilweise in die Enzymstruktur eindringen, was eine gewisse Mobilität der Substrate erfordert.
3. Am aktiven Zentrum muß die Substratstruktur eine für die Spaltung erforderliche Ausrichtung des Substrates zulassen. Dabei sind Substratstrukturen begünstigt, die unflexible (nicht „knickbare“) Kettenbereiche in möglichst geringer Konzentration und Länge besitzen.

Ausgehend von den Ergebnissen der Abbauuntersuchungen an den niedermolekularen Modellestern läßt sich bezüglich der Frage nach der Resistenz aromatischer Polyester gegenüber enzymatischen Angriffen folgern:



- Hinsichtlich der „Substratspezifität“ der für die Untersuchungen eingesetzten Lipasen ist eindeutig festzustellen, daß prinzipiell die Spaltung von Esterbindungen von aromatischen Säuren möglich ist. Allerdings liegen die Hydrolysegeschwindigkeiten von Estern aromatischer Säuren deutlich niedriger, als die von Estern aliphatischer oder cycloaliphatischer Säuren.
- Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen Schmelzpunkt und Abbaugeschwindigkeit ist nicht gegeben. Der oftmals beobachtete Zusammenhang bei Polyestern muß somit indirekter Natur sein.
- Eine Inhibierung des Abbaus durch Löslichkeitsbegrenzung von Abbauprodukten und damit einhergehender „Verkrustung“ der Oberfläche, ist bei den untersuchten Modellverbindungen nicht gegeben.

Bezüglich des Abbaus aromatischer Polyester kann folgendes Modell aufgestellt werden: Die räumlichen Verhältnisse am aktiven Zentrum der Lipasen begünstigen den Abbau von Polymerketten, die frei von rigiden Kettenbereichen sind. Eine Spaltung der aromatischen Esterbindungen findet deshalb hauptsächlich an Kettenenden statt (Exo-Abbau). Ob die durch die Hydrolyse entstehenden Abbauintermediate weitere enzymatisch gespalten werden, wird durch deren Hydrophilie bestimmt.

### 4.3 Aromatische Homopolyester

Aromatische Polyester, wie z.B. Polyethylenterephthalat (PET) und Polybutylenterephthalat (PBT), werden in der Literatur als biologisch inert beschrieben [YOSHIOKA et al. 1994, HEIDARY et al. 1994, HOPKINS 1993, EDGE et al. 1991]. Auch in dieser Arbeit erwies sich der aromatische Homopolyester PBT als resistent gegenüber der Lipase von *P. spezieis* (bei 37 oder 50 °C) und desintegrierte auch nicht in natürlicher Umgebung wie Erde oder Kompost (25 bzw. 50 °C).

Als Ursache für die Resistenz aromatischer Polyester gegenüber enzymatischen Angriffen werden, entsprechend der oft postulierten Abhängigkeit der biologischen Abbaubarkeit vom Schmelzpunkt der Substanzen, allgemein deren hohe Schmelzpunkte angeführt, die durch die chemische Struktur begründet sind [TOKIWA et al. 1990]. Die hohe Schmelztemperatur  $T_m$  des aromatischen Polyesters PBT ist gemäß Gleichung (4-1) auf die geringe Entropiedifferenz  $\Delta S$  beim Schmelzvorgang zurückzuführen [VOLLMERT 1988].

$$T_m = \frac{\Delta H_m}{\Delta S_m} \quad (4-1)$$

$T_m$  = Schmelztemperatur

$\Delta H_m$  = Enthalpieänderung beim Schmelzen

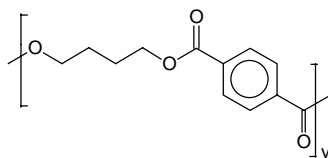
$\Delta S_m$  = Entropieänderung beim Schmelzen

Die geringe Entropiedifferenz  $\Delta S_m$  ist darin begründet, daß die Beweglichkeit (Flexibilität) der Polyesterketten sowohl im festen, als auch im flüssigen Aggregatzustand gering ist. Innerhalb der Polyesterketten liegen die Kohlenstoffatome des aromatischen Ringes und der zwei benachbarten Carbonyl-Gruppen in einer Ebene. Aufgrund dieser planaren Anordnung wird eine optimale Überlagerung der  $\pi$ -Elektronen des Benzolringes und der Carbonylgruppen ermöglicht, was die freie Drehbarkeit der Ketten beschränkt, woraus die geringe Kettenbeweglichkeit resultiert.

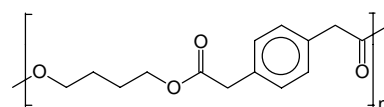
Der im vorherigen Kapitel beschriebene Einfluß der Kettenbeweglichkeit auf enzymatische Abbauraten von Polyester, zeigt sich auch im folgenden an einem neu synthetisierten aromatischen Polyester (Polybutylenphenylendiacetat PBPh). Es handelt sich hierbei um eine dem Polybutylenterephthalat verwandte Struktur, wobei die Terephthalsäure durch Phenylendiessigsäure ersetzt ist (Abb. 4-24).

Abb. 4-24:  
Strukturvergleich  
zweier aromatischer  
Polyester.

Poly(butylenterephthalat), PBT  
 $T_m = 227\text{ °C}$



Poly(butylphenylendiacetat), PBPh  
 $T_m = 73\text{ °C}$



PBPh unterscheidet sich strukturell von PBT durch eine Methylengruppe zwischen dem aromatischen Ring und der Carbonyl-Gruppen. Diese Methylengruppe verringert die elektronischen Wechselwirkungen zwischen dem Benzolring und der angrenzenden Carbonyl-Gruppen, wodurch die coplanar-antiparallele Anordnung der Estergruppen aufgehoben wird und sich die zwischen den Ketten wirksamen Anziehungskräfte verringern. Die Verringerung der zwischenmolekularen Kräfte und die erhöhte Kettenflexibilität erklärt die kleinere Polyesterschmelztemperatur von PBPh im Vergleich zu PBT (73 °C bzw. 227 °C).

Bezüglich des Schmelzpunktes ist PBPh mit dem bioabbaubaren aliphatischen Polyester SP 4/12 zu vergleichen ( $T_m = 72\text{ °C}$ ). Im Gegensatz zu SP 4/12 wurde Poly(butylphenylendiacetat) jedoch weder bei 37 °C noch bei der erhöhten Meßtemperatur von 50 °C von der Lipase von *P. spezie* hydrolysiert. Die dramatische Reduzierung der Schmelztemperatur von PBPh im Vergleich zu PBT hat somit nicht zu einer beschleunigten Hydrolyse des aromatischen Polyesters geführt. Dies unterstreicht die anhand der niedermolekularen Modellester erhaltenen Ergebnisse (s. Kapitel 4.2 ab Seite 28). Die biologische Abbaubarkeit der Polyester durch Lipasen wird nicht ausschließlich durch den Substratschmelzpunkt kontrolliert.

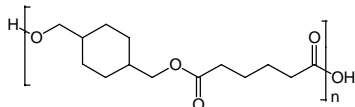
Trotz der im Vergleich zu PBT höheren Kettenbeweglichkeit von PBPh wurde PBT nicht enzymatisch hydrolysiert. Das Abbauergebnis läßt vermuten, daß auch die Ketten von PBPh noch nicht ausreichend flexibel sind, um das Einpassung der Polymerketten in das aktive Zentrum der Lipase zu ermöglichen.

Auch Polyester mit cycloaliphatischen Strukturen zeigen geringe Abbauraten. TOKIWA et al. (1986) untersuchten den Abbau von Polycyclohexylendimethyladipat (Struktur s. Abb. 4-25) mittels einer Lipase von *Rhizopus arrhizus* bei 37 °C. Dieser Polyester wurde im Vergleich zu den ebenfalls untersuchten aliphatischen Polyestern nur langsam hydrolysiert. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß der cycloaliphatische Polyester ( $T_m = 111\text{ °C}$ ) einen mehr als 40 °C

höheren Schmelzpunkt aufwies, als die übrigen von TOKIWA untersuchten aliphatischen Polyester ( $T_m = 57$  bis  $72$  °C).

Um einen cycloaliphatischen Polyester mit einer Schmelztemperatur im Bereich von aliphatischen Polyestern auf seine biologische Abbaurate zu untersuchen, wurde der cycloaliphatische Polyester Poly(dodecamethylencyclohexandicarbonat) synthetisiert (Struktur s. Abb. 4-25).

Poly(cyclohexylendimethyladipat)  
 $T_m \approx 111$  °C



Poly(dodecamethylencyclohexadicarbonat)  
 $T_m = 70$  °C

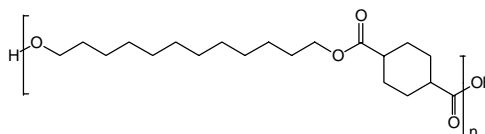


Abb. 4-25: Vergleich der Strukturen zweier cycloaliphatischer Polyester.

Mittels Lipase von *P. spezie*s wurde Poly(dodecamethylencyclohexandicarbonat) nur äußerst langsam gespalten (innerhalb von 20 Stunden wurden bei  $50$  °C nur ca.  $0,5$  % der vorhandenen Esterbindungen hydrolysiert). Die durch die Cyclen verringerte Kettenbeweglichkeit erklärt eventuell auch den langsamen Abbau dieses niedragschmelzenden cycloaliphatischen Polyesters.

Als Fazit der enzymatischen Abbauuntersuchungen an aromatischen und cycloaliphatischen Homopolyestern läßt sich feststellen, daß die enzymatische Abbaugeschwindigkeit wesentlich durch die Anwesenheit von Strukturelementen kontrolliert wird, die die Beweglichkeit der Polyesterketten verringern.

## 4.4 Aliphatische Homopolyester

Aliphatische Homopolyester gehören zu den bislang am häufigsten in Hinsicht auf ihre mikrobielle bzw. enzymatische Abbaubarkeit untersuchten Polymerstrukturen [FIELDS und RODRIGUEZ 1976, TOKIWA und SUZUKI 1977, WITT 1996]. Als Basis zum Verständnis des Abbauverhaltens der aliphatisch-aromatischen Copolyester, werden im folgenden umfassende und systematische Abbauntersuchungen an verschiedenen aliphatischen Polyesterstrukturen vorgestellt und diskutiert. In dieser Arbeit erfolgten erstmals an aliphatischen Polyestern systematische enzymatische Abbauntersuchungen bei erhöhten Meßtemperaturen.

### 4.4.1 Abstand der Estergruppen entlang der Polymerkette

Lineare aliphatische Homopolyester, die im Gegensatz zu den aromatischen Polyestern, keine die Ketten versteifenden Strukturen aufweisen, sollten prinzipiell enzymatisch spaltbar sein. Dennoch wurden deutliche Unterschiede in den Abbaugeschwindigkeiten verschiedener aliphatischer Polyester festgestellt, die mit Unterschieden in den Schmelztemperaturen begründet wurden [WITT 1996, FIELDS und RODRIGUEZ 1976].

Für 1,3-Propandiol basierte aliphatische Homopolyester stellte ROHWER (1994) in Abhängigkeit von der Kohlenstoffkettenlänge der aliphatischen Disäure (SP 3/2, SP 3/4, SP 3/6, SP 3/9, SP 3/10, SP 3/12, SP 3/13) eine maximale enzymatische Abbaurate (Lipase von *Rhizpus delemar*, 37 °C) für den Polyester SP 3/6 mit Adipinsäure als Säurekomponente (C 6-Disäure) fest. WITT (1996) erklärte die gemessene Optimumskurve zum einen in Anlehnung an TOKIWA et al. (1990) mit dem niedrigen Schmelzpunkt dieses Polyesters. Zum anderen vermutete WITT, daß bei Vorliegen von Adipinsäure in der Polymerkette der enzymatische Angriff dadurch begünstigt ist, daß eine maximale Übereinstimmung zwischen der Substratbindungsstelle auf der Enzymoberfläche und dem polymeren Substrat gegeben ist.

Auch TOKIWA und SUZUKI (1977) stellten bei einer Vielzahl von 1,2-Ethandiol- und 1,4 -Butandiol- basierenden aliphatischen Polyestern jeweils bei dem Adipinsäureester ein Maximum der enzymatischen Abbaurate mittels Lipase von *R. delemar* bei 30 °C fest. Diese Untersuchungen standen ebenfalls in Übereinstimmung mit Ergebnissen zum Abbau von Polyestern auf Basis von 1,4-Butandiol von FIELDS und RODRIGUEZ (1976). Auch bei Polyalkyltartrate wurden Polyester aus C 6- und C 8- Diolen schneller hydrolysiert, als die hydrophileren Polyester mit C 2- und C 4- Diolen oder die hydrophoberen Polyester mit C 10- und C 12- Diolen [BITRITTO et al. 1979]. Die Autoren erklärten das Abbauverhalten mit einer

für den enzymatischen Abbau optimalen Balance der hydrophoben und hydrophilen Polyesterseigenschaften.

Insgesamt ergeben die Diskussionen in der Literatur zum Abbau von aliphatischen Polyestern kein homogenes Bild. Durch die systematische Untersuchung aliphatischer Polyester bezüglich ihrer enzymatischen Spaltbarkeit sollen in dieser Arbeit einzelne Aspekte der oben genannten Diskussionen näher analysiert werden. Für die Untersuchungen wurden Polyester auf der Basis von 1,4-Butandiol eingesetzt. Im Vergleich zu den von WITT untersuchten Polyestern auf der Basis von 1,3-Propandiol waren diese aufgrund ihrer höheren Schmelztemperaturen (Tab. 4-6) auch für Abbauuntersuchungen bei einer für Kompost üblichen Temperatur von 50 °C geeignet.

Tab. 4-6: DSC- und GPC- Meßdaten von aliphatischen Homopolyester auf der Basis von 1,4-Butandiol.

Kurzform <sup>a)</sup>	Polyesterbezeichnung gemäß UIPAC	T <sub>m</sub> <sup>b)</sup> [°C]	M <sub>w</sub> <sup>c)</sup> [g mol <sup>-1</sup> ]	M <sub>n</sub> <sup>c)</sup> [g mol <sup>-1</sup> ]
SP 4/4	Poly(tetramethylsuccinat)	114	41000	23500
SP 4/6	Poly(tetramethylenadipat)	57	46200	29600
SP 4/8	Poly(tetramethylenoctanoat)	60	37600	21500
SP 4/10	Poly(tetramethylenodecanoat)	67	42600	23800
SP 4/12	Poly(tetramethylenododecanoat)	72	38200	20694

<sup>a)</sup> Bezüglich der Nomenklatur s. Tab. 3-2, Seite 11.

<sup>b)</sup> Maximum des Kristallit-Schmelzbereiches gemäß DSC-Messung.

<sup>c)</sup> GPC-Messung bezogen auf Polystyrol-Standard.

Allgemein steigen bei aliphatischen Polyestern die Schmelztemperaturen mit zunehmender Anzahl von C-Atomen innerhalb einer Repetiereinheit [BATZER 1985]. Eine Ausnahme stellt SP 4/4 dar, das aufgrund der hohen Kettensymmetrie (gleiche Anzahl von Methylengruppen in der Säure- und der Alkoholkomponente) einen relativ hohen Schmelzpunkt von 114 °C besitzt.

Die in Tab. 4-6 aufgeführten Polyester wurden in zwei Simulationstests (Abbauuntersuchung in Erde bzw. Kompost, Durchführung s. Kapitel 6.8.2.1 und Kapitel 6.8.2.2, ab Seite 147) auf ihren biologischen Abbau untersucht. Unter Berücksichtigung der anfänglichen Oberfläche der durch Schmelzpressen hergestellten einheitlichen Filme wurden flächennormierte Massenverluste berechnet und in Abhängigkeit von der Meßzeit in den zwei folgenden Abb. 4-26 (Erde) und Abb. 4-27 (Kompost) dargestellt.

Wie bei den enzymatischen Abbauuntersuchungen von TOKIWA und SUZUKI (1977) und

von ROHWER (1994) wurde der Adipinsäureester (SP 4/6) auch in dem komplexen Abbausystem Erde am schnellsten hydrolysiert.

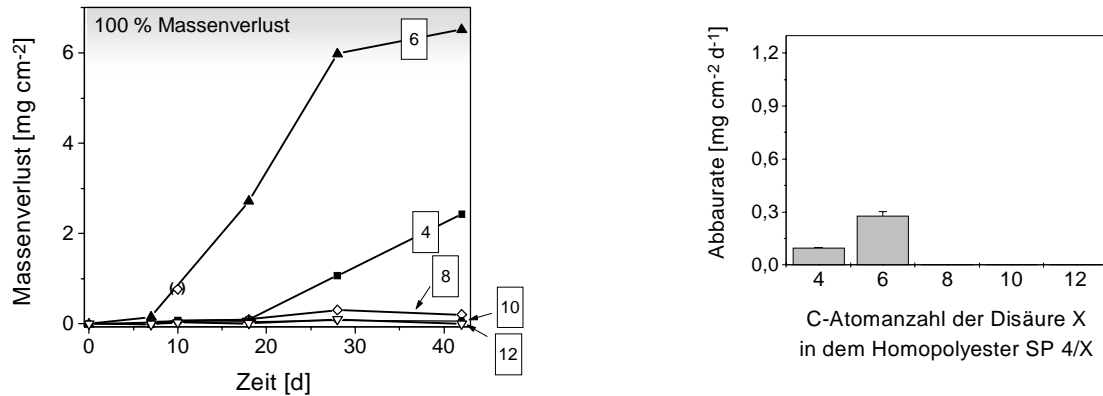


Abb. 4-26: Zeitabhängige Massenverluste (links) in Erde bei 25 °C und aus den linearen Bereichen der Abbaukurven ermittelte Abbauraten (rechts) von Homopolyestern SP 4/X in Abhängigkeit von der Disäure X (4=Bernsteinsäure, 6=Adipinsäure, 8=Korksäure, 10=Sebacinsäure, 12=Dodecandisäure). Die Fehlerbalken geben den Fehler der ermittelten Ausgleichsgeraden an.

Nach einer 30-tägigen Inkubationszeit war der Polymerfilm von SP 4/6 in Erde vollständig desintegriert, während die Polyester der längerkettigen Disäuren (SP 4/8, SP 4/10 und SP 4/12) kaum Gewichtsverluste ergaben.

Auch Abbauuntersuchungen in Kompost bei einer Meßtemperatur von 50 °C ergaben für den Adipinsäureester SP 4/6 (mit der geringsten Schmelztemperatur) die höchsten Abbauraten (Abb. 4-27).

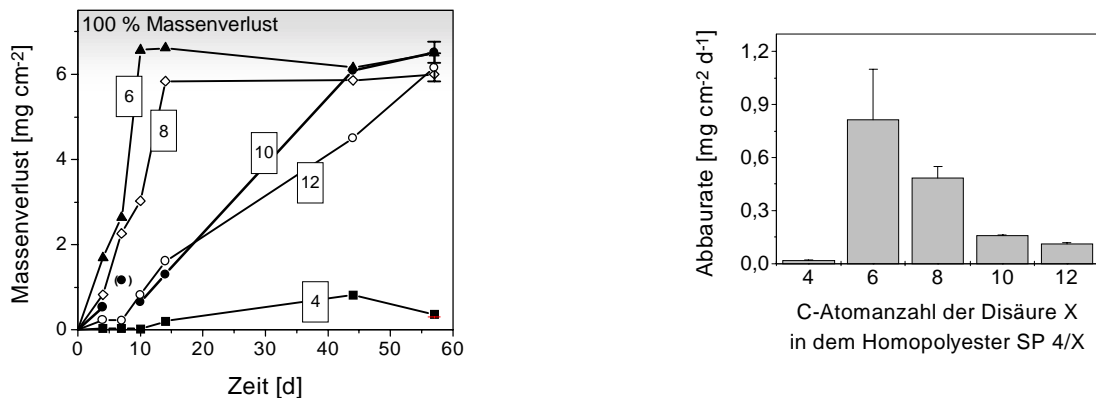


Abb. 4-27: Zeitabhängige Massenverluste (links) in Kompost bei 50 °C und aus den linearen Bereichen der Kurven ermittelte Abbauraten (rechts) von Homopolyestern SP 4/X in Abhängigkeit von der Disäure X (4=Bernsteinsäure, 6=Adipinsäure, 8=Korksäure,

10=Sebacinsäure, 12=Dodecandisäure). Die Fehlerbalken beziehen sich auf die ermittelten Ausgleichsgeraden.

Insgesamt wurden in Kompost deutlich höhere Abbauraten ermittelt als in Erde. Im Gegensatz zum Abbau in Erde bei 25 °C wurden in Kompost bei 50 °C auch die Polyester der längerkettigen Disäuren (SP 4/8, SP 4/10 und SP 4/12) innerhalb der 40-tägigen Testdauer vollständig desintegriert (SP 4/12 nahezu vollständig).

Für die insgesamt höheren Abbauraten und den signifikanten Abbau der Polyester längerkettiger Disäuren in Kompost kommen folgende Erklärungen in Betracht:

- *Biologische* Einflußgrößen:
  - a) Unterschiedliche *Mikroorganismenpopulationen* in Erde und Kompost mit unterschiedlichen synergistischen Effekten.
  - b) Die bei höheren Temperaturen in Kompost existierenden Mikroorganismen besitzen eine höherer *Aktivität*.
- *Polymer-spezifische* Einflußgrößen (Polyesterschmelztemperatur, Löslichkeit von Abbauprodukten).

#### 4.4.1.1 Einfluß biologischer Faktoren auf den biologischen Abbau

Zunächst soll der Frage nachgegangen werden, ob die in Kompost vorkommenden Mischpopulationen synergistisch zusammenwirken, oder ob auch eine Mikroorganismen-Reinkultur hohe Abbauraten und den Abbau von Polyestern mit langkettigen Disäuren (SP 4/10 und SP 4/12) hervorzurufen vermag. Hierzu werden mikrobielle Abbauuntersuchungen mit einer von KLEEGER et al. (1998) aus Kompost isolierten thermophilen, myzelartig wachsenden Aktinomycceten-Reinkultur von *Thermomonospora fusca* durchgeführt. KLEEGER konnte zeigen, daß dieser Stamm wenig substratspezifisch ist und neben aliphatischen Homopolyestern (SP 3/13, SP 4/4 und PHB) auch aliphatisch-aromatische BTA-Copolyester (BTA 40:60 und BTA 60:40) sowie ein kommerzielles Polyesteramid (Bayer Tir 1874) hydrolysiert. Während KLEEGER den Aktinomyccetenstamm bei der optimalen Wachstumstemperatur von 55 °C einsetzte, konnte hier aufgrund des geringen Schmelzpunktes des Polyesters SP 4/6 ( $T_m = 57\text{ °C}$ ) nur bei maximal 50 °C gearbeitet werden.

Bei der Meßtemperatur von 50 °C waren die Polymerfilme von SP 4/6 nach 8 Tagen schon vollständig und die von SP 4/8 fast vollständig desintegriert, so daß für diese Proben keine exakten Abbauraten angegeben werden konnten, was in Abb. 4-28 durch Pfeile kenntlich



gemacht ist. So wurde ein weiterer Abbauversuch bei nur 40 °C durchgeführt (Abb. 4-28).

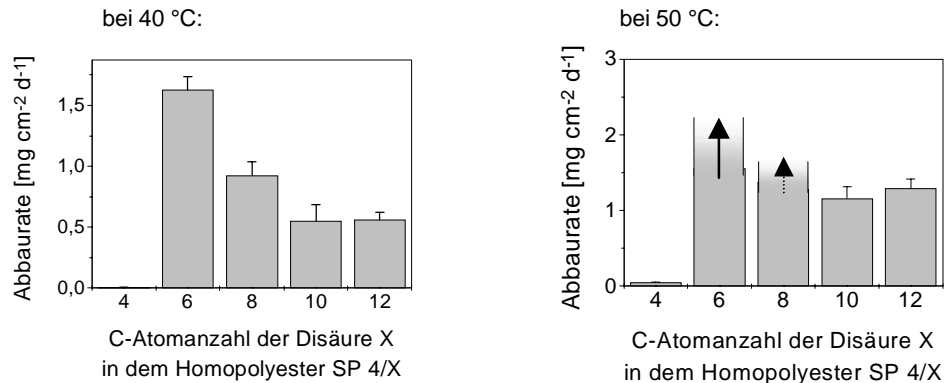


Abb. 4-28: Abbauraten mittels einer Mikroorganismen-Reinkultur von *T. fusca* in einem 8-tägigen Agarplattentest bei 40 °C (links) bzw. 50 °C (rechts) von Homopolyestern SP 4/X in Abhängigkeit von der Disäure X (4=Bernsteinsäure, 6=Adipinsäure, 8=Korksäure, 10=Sebacinsäure, 12=Dodecandisäure).

Das relative Abbauverhalten der Polyester durch die Mikroorganismen-Reinkultur war mit dem in Kompost zu vergleichen (vgl. Abb. 4-28 mit Abb. 4-27). Die Polyester der langkettigen Dicarbonsäuren (SP 4/10 und SP 4/12), die bei 25 °C in Erde nicht abgebaut wurden, ergaben merkbare Massenverluste. Da die Abbauergebnisse mit dem Einzelorganismus ein ähnliches Bild ergaben wie der Abbau im Realsystem (Kompost), läßt sich auch der Abbau von Polyestern mit langkettigen Disäuren nicht auf synergistische Effekte von Mikroorganismen-Mischpopulationen zurückführen.

Wieso wurden die Polyester der langkettigen Säuren nicht bei 25 °C in Erde hydrolysiert? Zur Klärung des Einflusses der Meßtemperatur wurden enzymatische Abbauuntersuchungen mittels Lipase von *P. spezieis* bei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt (Abb. 4-29). Eine vergleichbare Untersuchung mit ganzen lebenden Zellen erschien aufgrund der Komplexität von lebenden Organismen zu aufwendig und zu schwer interpretierbar.

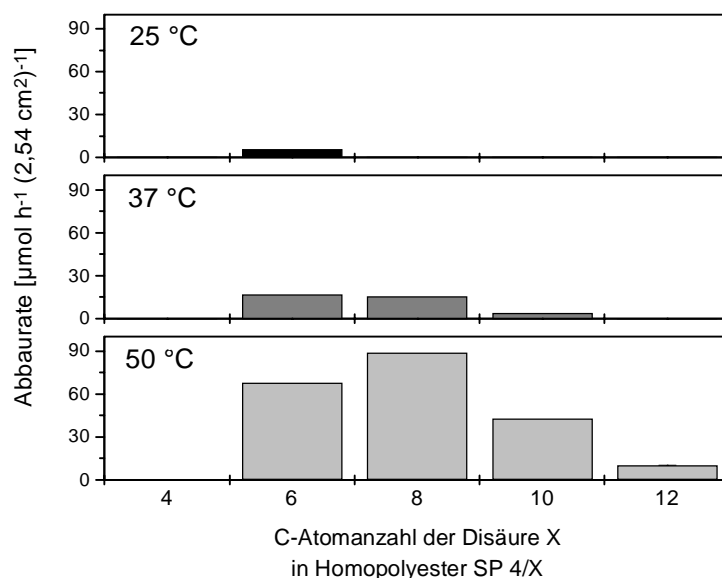


Abb. 4-29: Abbauraten mittels Lipase von *P. spezie*s von Homopolyestern SP 4/X in Abhängigkeit von der Kettenlänge der Disäurekomponente X (4=Bernsteinsäure, 6=Adipinsäure, 8=Korksäure, 10=Sebacinsäure, 12=Dodecandisäure).

Die Steigerung der Meßtemperatur hatte zwei Auswirkungen auf die enzymatischen Abbauraten der Polyester (Abb. 4-29).

- Mit zunehmender Meßtemperatur stiegen die Abbauraten für gleiche Polyester. Durch Verdoppelung der Reaktionstemperatur von 25 °C auf 50 °C verzehnfacht sich beispielsweise die Abbauration von SP 4/6. Im Vergleich dazu stieg die Abbauration des niedermolekularen Modellesters 1 bei dieser Temperaturerhöhung nur um den Faktor 2 (vgl. Abb. 4-6, Seite 24).
- Das Maximum der Abbauraten verschob sich bei den aliphatischen Polyestern zugunsten der längerkettigen Dicarbonsäuren. Der enzymatische Abbau von Polyestern langkettiger Disäuren (SP 4/10 und SP 4/12) erfolgte beispielsweise nur bei Meßtemperaturen oberhalb von 25 °C. Diese Verschiebung zeigt, daß die Unterschiede in den enzymatischen Abbauraten der Polyester nicht auf eine Substratspezifität der Lipase zurückzuführen sind.

Die temperaturabhängige Zunahme der enzymatischen Abbauraten (Abb. 4-29) ist besonders vor dem Hintergrund der beobachteten thermischen Enzymdenaturierung bemerkenswert (vgl. Abb. 4-7, Seite 25). So halbierte sich beispielsweise bei 50 °C die Enzymaktivität innerhalb von 2 Stunden. Die Abbaukurven der Polyester ließen diese starke Enzymdenaturierung nicht erkennen und stiegen über mehrere Stunden nahezu linear an

(Abb. 4-30). Zu einer merklichen Verlangsamung der Abbaugeschwindigkeit kam es erst nach vollständigen Überführung der Polymerfilme in wasserlösliche Produkte.

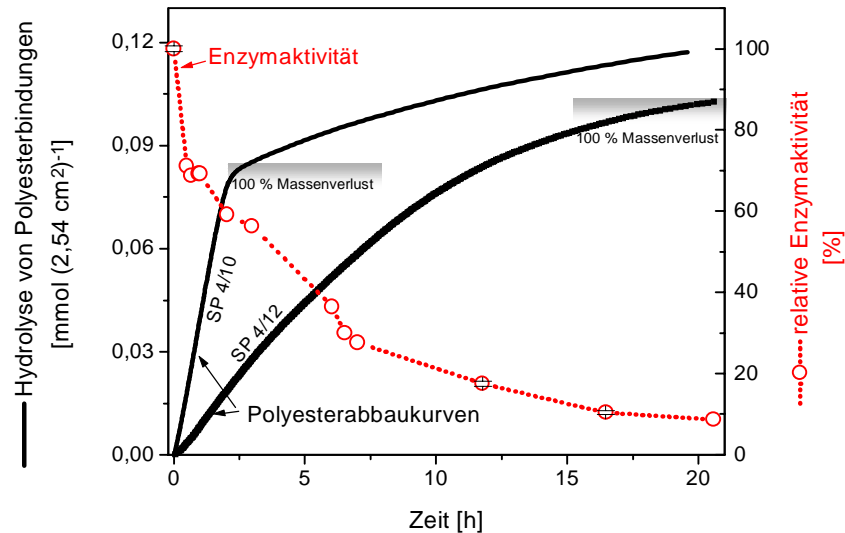


Abb. 4-30: Enzymatische Abbaukurven zweier Polyester (SP 4/10 und SP 4/12) mittels Lipase von *P. spezzies* bei 50 °C im Vergleich zu der bei gleicher Temperatur gemessenen Abnahme der Enzymaktivität als Funktion der Zeit.

Als Fazit lässt sich feststellen, daß die enzymatischen Abbauraten der aliphatischen Polyester mit steigender Meßtemperatur trotz der beobachteten thermischen Enzymdenaturierung stark anstiegen. Die Abbaugeschwindigkeiten der Polyester werden folglich im wesentlichen nicht durch die Biologie bestimmt, sondern offenbar durch Polymer-spezifische Parameter. Der Einfluß von Polymer-spezifischen Parameter auf den biologischen Abbau aliphatischer Polyester soll im folgenden Kapitel untersucht werden.

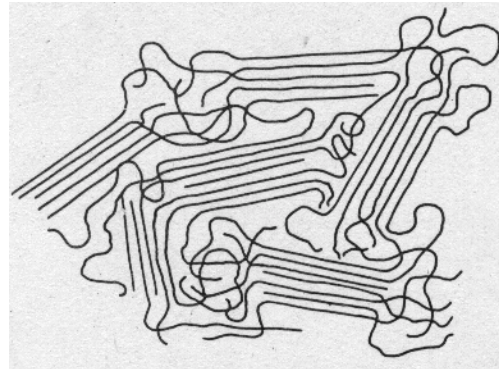
#### 4.4.1.2 Einfluß Polymer-spezifischer Faktoren auf den biologischen Abbau

##### 4.4.1.2.1 Schmelztemperatur der Polyester

Die höherschmelzenden Polyester SP 4/10 und SP 4/12 zeigten in Erde bei 25 °C keine Hydrolyse, wohingegen bei der erhöhten Temperatur in Kompost (50 °C) ein signifikanter Massenverlust gemessen wurde. Somit scheint die Hydrolysegeschwindigkeit weniger eine Funktion der absoluten Polyesterschmelztemperatur zu sein, als vielmehr eine Funktion der relativen Entfernung zwischen der Polyesterschmelztemperatur ( $T_m$ ) und der Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}}$ ). Wie kann die Hydrolysegeschwindigkeit von dieser Temperaturdifferenz abhängen?

Für teilkristalline Polymeren (vgl. Abb. 4-31) ist allgemein üblich als Schmelztemperatur die Temperatur zu definieren, bei der die meisten Kristallite schmelzen [BATZER 1985].

Abb. 4-31:  
Fansenmicelle [VOLLMERT 1988]:  
Unregelmäßige Anordnung der aus  
Kettenbündeln bestehenden kristallinen  
Bereiche.



Bei Annäherung an die Kristallitschmelztemperatur nehmen die Bewegungen der Polymerketten zu, bis sie am Kristallitschmelzpunkt  $T_m$  ausreichen, um die innerhalb der Kristallite wirksamen elektrostatischen Anziehungsenergien  $E$  zu überwinden. Die Ketten der Kristallite gleiten voneinander ab und lösen sich aus dem Verbund. Bei Molekülen mit polaren Gruppen wie den Carbonylgruppen der Esterbindungen liegen zusätzlich zu den schwächeren Dispersionskräften elektrostatische Anziehungskräfte  $E$  zwischen den Dipolmomenten  $\mu_1$  und  $\mu_2$  der Polymerketten vor. Gemäß Gleichung (4-2) sind die elektrostatischen Anziehungskräfte umgekehrt proportional zur sechsten Potenz des Abstandes  $R$  der wechselwirkenden Pole und umgekehrt proportional zur Temperatur  $T$  [ATKINS 1990].

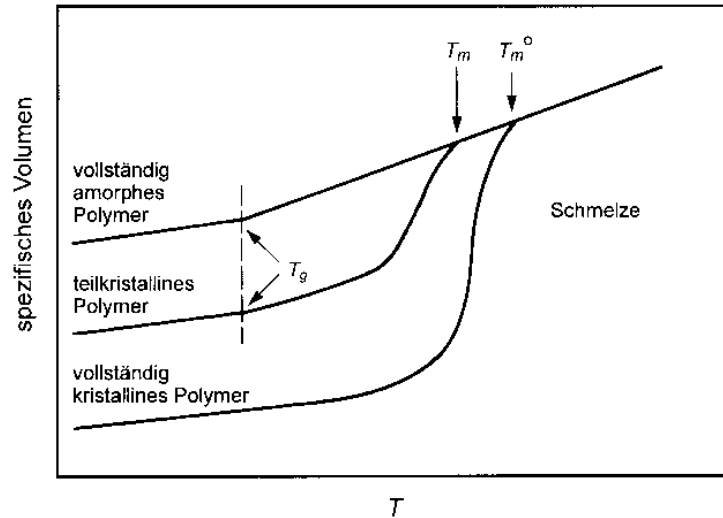
$$E = \frac{\left[\frac{2}{3 \cdot k \cdot T}\right] \cdot \left[\frac{\mu_1 \cdot \mu_2}{4 \cdot \pi \cdot \epsilon_0}\right]^2}{R^6} \quad (4-2)$$

$E$  = Wechselwirkungsenergie  
 $k$  = Boltzmann-Konstante  
 $R$  = Abstand  
 $\mu_1, \mu_2$  = Dipolmomente  
 $\epsilon_0$  = Dielektrizitätskonstante

Die temperaturbedingte Verringerung der zwischen den Ketten wirksamen Kräfte bei der Annäherung an den Kristallitschmelzpunkt  $T_m$  zeigt sich bei kristallinen und teilkristallinen Polymeren auch makroskopisch in einer Zunahme des spezifischen Volumens (Abb. 4-32).

Abb. 4-32:

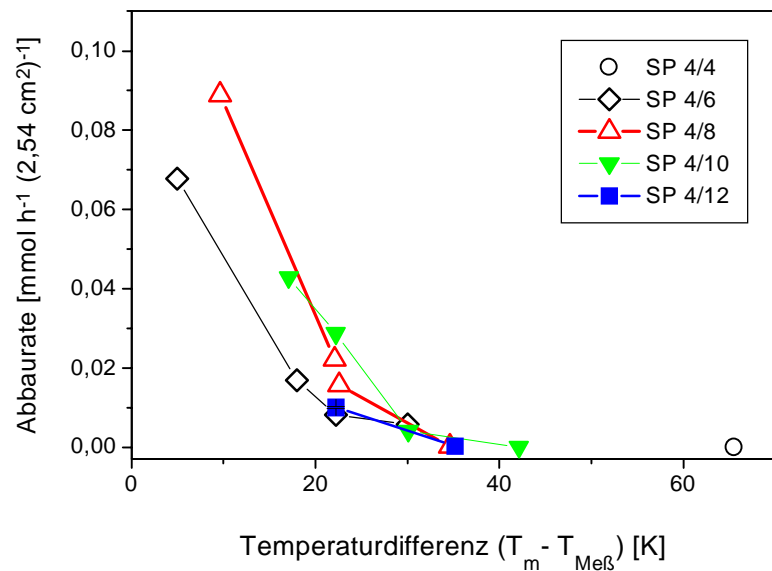
Temperaturabhängige Zunahme des spezifischen Volumens eines vollständig amorphen, eines teilkristallinen und eines vollständig kristallinen Polymeren [TIEKE 1997].



Vor Erreichen des Kristallitschmelzpunktes  $T_m$  ist eine ausgeprägte Volumenzunahme erkennbar, was mit einer Zunahme der Kettenmobilität einhergeht. Bei Annäherung an die Kristallitschmelztemperatur, d.h. bei Verringerung der Differenz zwischen Polyesterschmelztemperatur  $T_m$  und Meßtemperatur  $T_{\text{Meß}}$ , stiegen auch die Abbauraten der untersuchten linearen teilkristallinen Polyester deutlich an (Abb. 4-33).

Abb. 4-33:

Vergrößerung der enzymatischen Abbauraten von aliphatischen Polyestern bei Verringerung der Differenz zwischen Polyesterschmelztemperatur ( $T_m$ ) und Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}}$ ) (Lipase von *P. spezie*).

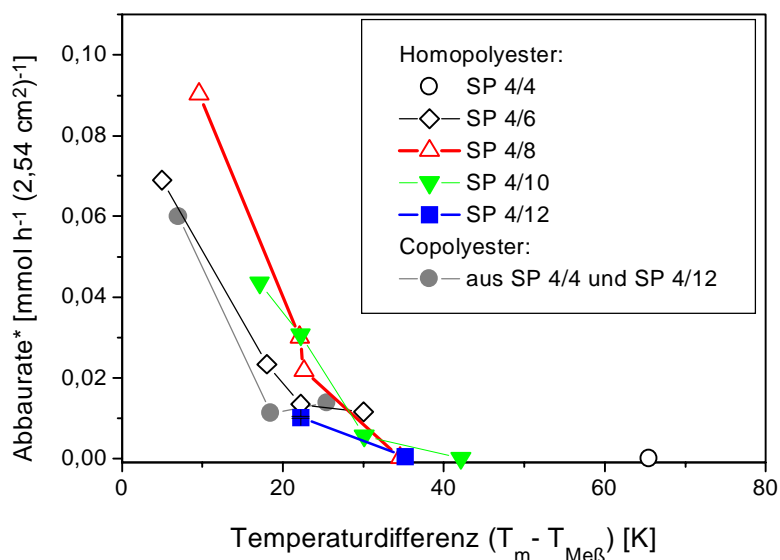


Bei einer Temperaturdifferenz ( $T_m - T_{\text{Meß}}$ ) größer 35 bis 40 °C, wurde keiner der aliphatischen Polyester enzymatisch abgebaut. Unterhalb einer Differenz von 30 °C stiegen die Abbauraten der Polyester jedoch stark an.

Die bei einer einheitlichen Temperaturdifferenz von z.B. 22 °C gemessenen Abbauraten unterschieden sich in ihrer absoluten Größe (Abb. 4-33). Es ist zu berücksichtigen, daß die Ergebnisse bei unterschiedlichen Meßtemperaturen und damit unterschiedlichen Enzymaktivitäten ermittelt wurden. Zum Ausgleichen des Einflusses der Enzymaktivitäten erfolgte eine Korrektur der Abbauraten. Dazu wurde die bei 50 °C ( $T_{\text{Meß}}$ ) gegenüber dem niedermolekularen Modellester Adipinsäuredibutylester 1 ermittelte Enzymaktivität gleich 1 gesetzt (Abb. 4-6, Seite 24). Die bei Meßtemperaturen unterhalb von  $T_{\text{Meß}} = 50$  °C ermittelten Enzymaktivitäten lagen bei relativen Abbauraten zwischen 0,5 und 1. Zur Nivellierung des Temperatureinflusses der Enzymaktivität wurden die Abbauraten der aliphatischen Homopolyester durch die normierten Enzymaktivitäten dividiert. Die so berechneten korrigierten Abbauraten (Abbaureate\*) sind in Abb. 4-34 dargestellt.

Abb. 4-34:

Bezüglich der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität korrigierte (\*) enzymatische Abbauraten (Lipase von *P. spezieis*) von aliphatischen Homopolyestern in Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelz- ( $T_m$ ) und Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}}$ ).



Insgesamt verändert sich die graphische Darstellung durch die Berücksichtigung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität nur unwesentlich. Folglich wurden die gemessenen Abbauraten bei den Polyestern weniger durch die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität beeinflusst (wie schon in Kapitel 4.4.1.1 angedeutet), als vielmehr durch die Temperaturabhängigkeit einer Polyestereigenschaft. Die temperaturabhängige Verringerung der zwischen den Polymerketten der Kristallite wirkenden Anziehungskräfte und die damit verbundene Zunahme der Kettenmobilität am Polymerschmelzpunkt scheint die Abbaugeschwindigkeit der teilkristallinen Polyester zu kontrollieren.

Für die Abbaugeschwindigkeit der linearen aliphatischen Polyester ist somit hauptsächlich das thermische Verhalten der kristallinen Bereiche (Kristallitschmelztemperatur) entscheidend. Diese Aussage scheint zunächst im Widerspruch zu Abbauuntersuchungen

der linearen Polyester SP 4/4 [YOO und IM 1999] und PCL [MOCHIZUKI et al. 1995, GAN et al. 1997, BENEDICT et al. 1983 a, BENEDICT et al. 1983 b, COOK et al. 1981] zu stehen. Für diese teilkristallinen Polyester wurde gezeigt, daß zunächst die weniger geordneten amorphen Bereiche (vgl. Franzenmicelle in Abb. 4-31) angegriffen werden, deren enzymatische Hydrolyse deutlich schneller erfolgt, als die Hydrolyse der kristallinen Bereiche. Wie kontrolliert nun die Schmelztemperatur als Eigenschaft der kristallinen Bereiche die vorzugsweise in den amorphen Bereichen ablaufende enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit? Dieser scheinbare Widerspruch läßt sich durch folgende Modellvorstellung in Einklang bringen:

Der schnellere enzymatische Abbau der amorphen Bereiche führt zu einer Anreicherung von Kristalliten an der Polymeroberfläche. Der langsame Abbau der Kristallite kontrolliert die Abbaugeschwindigkeit der teilkristallinen Polyester. Unter Annäherung an die Kristallit-schmelztemperatur wird die Ordnung innerhalb der Kristallite verringert und die Mobilität der Polyesterketten nimmt zu. Dadurch wird deren enzymatische Spaltbarkeit gesteigert und somit der die Abbaurrate kontrollierende Reaktionsschritt stark beschleunigt.

Die Abbaurrate des Polyesters SP 4/4 konnte durch Steigerung der Meßtemperatur innerhalb des enzymatisch möglichen Rahmen (bis 50 °C) nicht gesteigert werden. Aufgrund des relativ hohen Schmelzpunktes ( $T_m = 114$  °C) war für diesen Polyester keine so starke Annäherung der Meßtemperatur an die Polyesterschmelztemperatur möglich, wie für die restlichen aliphatischen Homopolyester.

In den hier bei 50 °C durchgeführten enzymatischen Abbauuntersuchungen wurde der Polyesterfilm von SP 4/4 nach der 20-stündigen Versuchszeit ohne Massenverlust aus dem Versuchsansatz isoliert. Demgegenüber maßen KHAN et al. (1999) unter Einsatz der Lipase AK bei der gleichen Meßtemperatur, allerdings nach einer deutlich längeren Meßzeit von 50 Stunden, einen 10 %-igen Massenverlust. Durch Steigerung der Meßtemperatur von 50 auf 70 °C konnte KHAN den Massenverlust sogar auf ca. 50 % steigern. Dieses bestätigt die Hypothese, daß auch SP 4/4 spaltbar ist, sofern die Differenz zwischen Meß- und Polyesterschmelztemperatur verringert wird.

Eine enzymatische Spaltung der Esterbindungen von SP 4/4 konnte auch an einem statistischen Copolyester aus 1,4-Butandiol, Bernsteinsäure und Dodecandisäure (40 mol-% Succinat, 60 mol-% Dodecanoat) gezeigt werden. Die Schmelztemperatur dieses statistischen Copolyesters lag mit  $T_m = 55$  °C unterhalb der Schmelztemperaturen beider Homopolyester (114 bzw. 72 °C). Dadurch erklärt sich die im Vergleich zu den aliphatischen

Homopolyestern höhere Abbaurate des Copolyesters (vgl. Abb. 4-34, Seite 56). Dieser Copolyester wurden zu etwa 80 % gespalten, woraus geschlossen werden kann, daß neben Esterbindungen der Dodecandisäure, die einen Anteil von nur 60 % ausmachten, auch solche der Bernsteinsäure hydrolysiert wurden. Dabei verlief der Abbau nicht etwa in zwei Stufen, sondern über den gesamten Zeitraum des Titrationsversuches wurde bis zum 100 %-igen Massenverlust eine nahezu konstante Abbaurate gemessen. Daraus läßt sich ableiten, daß in dem aliphatischen Copolyester die Succinat- und Dodecanoatbindungen mit gleicher Geschwindigkeit hydrolysiert wurden.

Die Ergebnisse der Abbauntersuchungen an den aliphatischen Homopolyestern zeigen, daß die biologische Abbaubarkeit innerhalb einer Polyestergruppe eng mit der Kristallitschmelztemperatur zusammenhängt. Durch Erhöhung der Meßtemperatur ließen sich die Abbauraten z.T. erheblich steigern. Besonders bei Verringerung der Differenz zwischen Polyesterschmelztemperatur und Meßtemperatur auf weniger als 30 °C vergrößerten sich die enzymatischen Abbauraten der linearen Polyester mittels Lipase von *P. spezies* stark. Dies kann mit der unter Annäherung an den Schmelzpunkt sinkenden kristallinen Fernordnung unter gleichzeitigem Anstieg der Kettenmobilität interpretiert werden. Die Abbaugeschwindigkeit der teilkristallinen aliphatischen Polyester wird folglich von der Abbaugeschwindigkeit der Kristallite kontrolliert.

#### 4.4.1.2.2 Löslichkeit von Abbauprodukten

Sofern die Abbaugeschwindigkeit ausschließlich eine Funktion der Temperaturdifferenz zwischen Kristallitschmelztemperatur und Meßtemperatur ist, wäre zu erwarten, daß strukturell ähnliche Polyester bei gleicher Temperaturdifferenz vergleichbare enzymatische Abbauraten zeigen (unter Vernachlässigung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivitäten). Um diese Schlußfolgerung zu verifizieren, wurden die aliphatischen Polyester auf Basis von 1,4-Butandiol bei unterschiedlichen, jeweils 22 °C unterhalb des Schmelzpunktes, liegenden Meßtemperaturen enzymatisch abgebaut (Abb. 4-35).

Im Gegensatz zu der Voraussage, stiegen die gemessenen enzymatischen Abbauraten der aliphatischen Homopolyester bei einer einheitlichen Temperaturdifferenz von 22 °C mit zunehmender Kettenlänge der Säurekomponente an (Abb. 4-35). Dieser Anstieg erklärt sich mit der analog ansteigenden absoluten Meßtemperatur und der damit verbundenen Steigerung der Enzymaktivität.



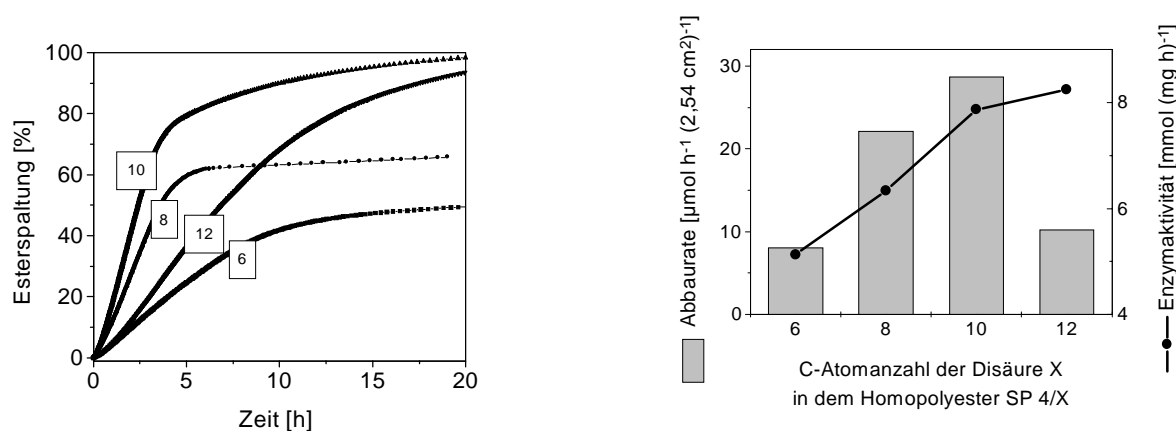


Abb. 4-35: Zeitabhängige Abbaukurven (links) von aliphatischen Homopolyestern SP 4/X mittels Lipase von *P. spezies* und aus den Anfangssteigungen der Kurven berechnete Abbauraten (rechts). Die Meßtemperaturen der Abbauuntersuchungen lagen jeweils 22 °C unterhalb der Polyesterschmelztemperaturen. Zum Vergleich sind die bei den jeweiligen Meßtemperaturen gegenüber dem niedermolekularen Modellester Adipinsäuredibutylester 1 ermittelten Enzymaktivitäten angegeben (Kurve in der rechten Teilabbildung).

Nur der Polyester SP 4/12 wurde trotz einer relativ hoher Enzymaktivität vergleichsweise langsam hydrolysiert, was auf die schlechte Löslichkeit der Abbauprodukte zurückzuführen sein könnte. Bei der Hydrolyse von SP 4/12 entsteht die hydrophobe Dodecandisäure, deren Löslichkeit in Wasser vergleichsweise gering ist (Löslichkeit der Disäuren s. Abb. 8-10, Seite 166).

Bei Abbauprozessen von polymeren Feststoffen zu wasserlöslichen Produkten könnten thermodynamische Lösungsgleichgewichte oder kinetische Transportvorgänge die Abbaugeschwindigkeit kontrollieren. Im folgenden wird zunächst untersucht, ob im Fall des Polyesters SP 4/12 der Abtransport der Abbauprodukte durch eine begrenzte thermodynamische Löslichkeit der Spaltprodukte verzögert war.

Die  $\text{pK}_s$ -Werte aller als Spaltprodukte denkbaren Säuren liegen unterhalb des bei den enzymatischen Abbauversuchen konstant gehaltenen pH-Wertes von  $\text{pH} = 7,0$ , so daß Säuren im enzymatischen Abbautest durch die zugesetzte Natronlauge in die Salze überführt werden. In Tab. 4-7 sind die berechneten Säure- und Natriumsalzkonzentrationen angegeben, wobei eine vollständige (100 %-igen) Spaltung aller vorhandenen Esterbindungen vorausgesetzt ist.

Tab. 4-7: Säure- bzw. Natriumsalzkonzentrationen unter den Randbedingungen des enzymatischen Abbautests bei Annahme einer vollständigen Hydrolyse der aliphatischen Polyester SP 4/X:

Im Vergleich zu den berechneten maximalen Konzentrationen sind die Säure- bzw. Natriumsalzkonzentrationen angegeben, die in destilliertem Wasser bei 5 bis 55 °C löslich sind.

Polyester			Saure Spaltprodukte				
Polyester	M <sub>REP</sub> <sup>a)</sup> [g mol <sup>-1</sup> ]	Masse [mg]	Säure	Konzentration <sup>b)</sup> [g (100ml) <sup>-1</sup> ]		Löslichkeit <sup>c)</sup> bei 5 bis 55 °C [g (100ml) <sup>-1</sup> ]	
				Säure	Na-Salz	Säure	Na-Salz
SP 4/4	172,2	18,5	Bernsteinsäure	0,21	0,29	3-15	>60
SP 4/6	200,2	16,1	Adipinsäure	0,20	0,25	0,8-8	53-74
SP 4/8	228,3	16,8	Korksäure	0,21	0,27	0,08-1	48-57
SP 4/10	256,3	16,4	Sebacinsäure	0,22	0,26	0,04-0,1	23-25
SP 4/12	284,4	15,1	Dodecandisäure	0,20	0,24	0-0,02	9-11

- a) Molmasse einer Polyester-Repetiereinheit aus 1,4-Butandiol und der jeweiligen Disäure.  
b) Unter Voraussetzung einer 100 %-igen Spaltung der vorhandenen Esterbindungen entstehen bei der Hydrolyse des angegebenen Polyesters die angegebenen Säure- bzw. Natriumsalzkonzentrationen bei den Randbedingungen der enzymatischen Abbauntersuchungen (6 ml Gesamtvolumen).  
c) In destilliertem Wasser lösen sich bei 5 bis 55 °C die angegebene Säure- bzw. Natriumsalzkonzentration. Die Meßdaten zur Löslichkeit der Säuren sind in Abhängigkeit von der Temperatur in Abb. 8-10 (Seite 166) dargestellt.

Die gebildeten Salzkonzentrationen lagen weit, mindestens 40 bis über 300 mal unterhalb der thermodynamischen Sättigungskonzentrationen, die experimentell für die verschiedenen Salze bestimmt wurden (Tab. 4-7, Durchführung s. 6.6, Seite 140). Folglich ist im oben beschriebenen enzymatischen Abbautest keine thermodynamische Limitierung der Abbaugeschwindigkeit durch eine Annäherung der Spaltproduktkonzentrationen (Salze oder Alkohole) an die Sättigungskonzentration zu erwarten.

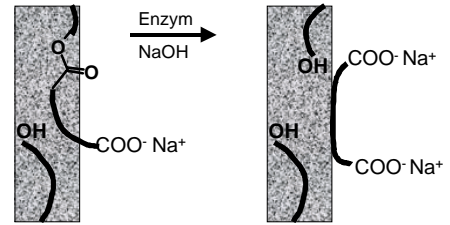
Nachdem für die untersuchten aliphatischen Polyester eine Kontrolle der Abbaugeschwindigkeiten durch eine thermodynamische Limitierung der Produktlöslichkeiten ausgeschlossen werden konnte, soll nun geklärt werden, ob eventuell die Ablösegeschwindigkeit der Spaltprodukte von der Polyesteroberfläche zur Erklärung der unerwartet langsamen Spaltung von SP 4/12 herangezogen werden kann.

Für Auflösungsvorgänge ist allgemein zu beachten, daß ein zu lösendes Teilchen vollständig solvatisiert sein muß, bevor es sich von dem restlichen Feststoff löst [VOLLMERT 1988]. Im Fall des SP 4/12 ist denkbar, daß hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der Kohlenwasserstoffkette (10 Methylengruppen) des gebildeten Natriumdodecanoats und der

hydrophoben Feststoffoberfläche den Ablöseprozeß des Produktes kinetisch verzögern (Abb. 4-36).

Abb. 4-36:

Verlangsamtes Ablösen von Abbauprodukten durch hydrophobe Wechselwirkungen.



Eine solche „Passivierung“ der Polymeroberfläche würde den enzymatischen Abbau der darunterliegenden Polyesterketten aus sterischen Gründen verlangsamen. Zur Simulation einer kinetischen Limitierung der Abbauprozesse wurden von den verschiedenen Säuren gleiche Massen von gesiebten Feststoffpulvern (Partikeldurchmesser 0,2-0,3 mm) in 0,9 %-ige Natriumchloridlösung gegeben. Unter den Bedingungen der enzymatischen Abbauntersuchungen wurden dann die Auflösengeschwindigkeiten sichtbar gemacht (Durchführung s. Kapitel 6.7, Seite 141). Von den Säuren wurden jeweils 10 mg eingesetzt (Partikeldurchmesser= 0,2-0,3 mm), was etwa der Säuremasse in den Polymerfilmen entsprach. Allerdings waren die Säuremassen bei den kinetischen Untersuchungen zur Auflösengeschwindigkeit auf einer deutlich größeren Oberfläche (Faktor 1300 bis 1900) verteilt. Trotz der großen Oberfläche die Neutralisation der reinen Säuren stark verzögert (Abb. 4-37).

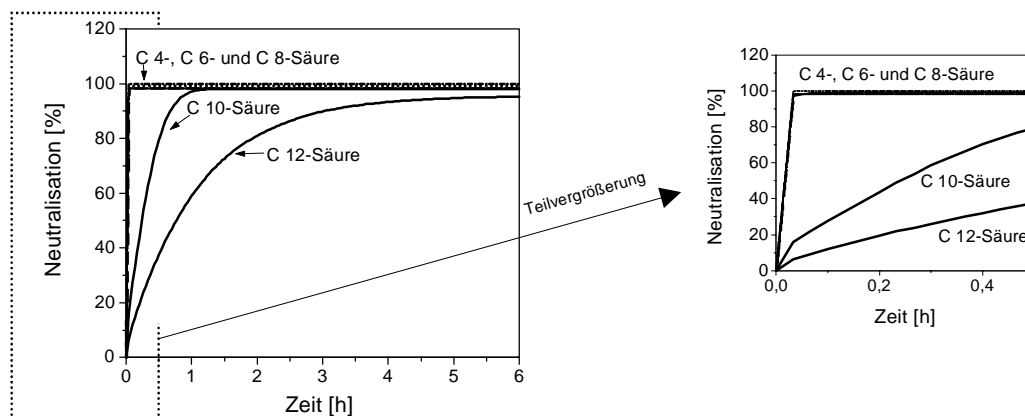


Abb. 4-37: Auflösengeschwindigkeit aliphatischer Disäuren (C 4= Bernsteinsäure, C 6= Adipinsäure, C 8= Korksäure, C 10= Sebacinsäure, C 12= Dodecandisäure) bei 37 °C unter den Bedingungen der enzymatischen Abbauntersuchungen (pH-Stat Titration bei pH 7,0). Zur Verdeutlichung ist rechts der Reaktionsverlauf der ersten 30 Minuten vergrößert.

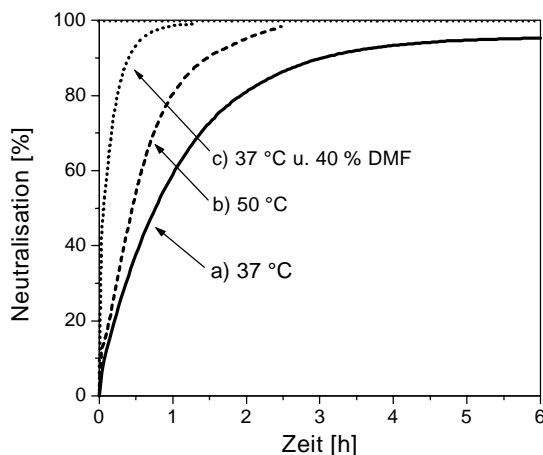
Die Auflösegeschwindigkeit der Säuren nahm mit zunehmender Säurekettenlänge deutlich ab. Die kurzkettigen Disäuren mit 4 bis 8 Kohlenstoffatomen, wurden innerhalb weniger Sekunden neutralisiert, während die Neutralisation der länger-kettigen Disäuren z.T. Stunden dauerte (Abb. 4-37). Sebacinsäure (C 10- Disäure) war nach einer Stunde vollständig neutralisiert, Dodecandisäure (C 12- Disäure) hingegen erst nach über 6 Stunden.

Der Vergleich der oben gezeigten Neutralisationskurven der Disäuren mit den enzymatischen Abbaukurven der Polyester zeigt (s. Abb. 4-35, Seite 59), daß die Auflösegeschwindigkeiten der länger-kettigen Säuren (C 10- und C 12-Disäure) in einer vergleichbaren Größenordnung lagen, wie die enzymatischen Abbauraten der entsprechenden Polyester (SP 4/10 und SP 4/12). Folglich kann der Teilschritt der Neutralisation innerhalb der Reaktionsabfolge des enzymatischen Abbaus von Polyesterfilmen den limitierenden geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellen. Dieses würde die unerwartet geringe Abbaugeschwindigkeit des Polyesters SP 4/12 erklären.

Eine solche reaktions-kinetische Limitierung des Abbaus konnte für die aromatischen Homopolyester (PBT, PBPh) ausgeschlossen werden. Unter den Versuchsbedingungen des enzymatischen Abbautests wurden sogar die weniger löslichen aromatischen Monocarbonsäuren ohne detektierbare Verzögerung neutralisiert (vgl. Neutralisationskurven für Benzoesäure und Phenyllessigsäure Abb. 8-9, Seite 166).

Sofern hydrophobe Wechselwirkungen die Auflösegeschwindigkeit der Dodecandisäure limitieren, ist in Gegenwart des organischen Lösungsmittels Dimethylformid (DMF), das eine geringere Polarität als Wasser besitzt, eine Verringerung der hydrophoben Interaktionen und eine Erhöhung der Abbauraten zu erwarten.

Abb. 4-38:  
Auflösegeschwindigkeit von  
Dodecandisäure unter den  
Bedingungen der enzymatischen  
Abbauuntersuchungen (pH-Stat  
Titration bei pH 7,0) in Abhängigkeit  
von der Temperatur a) 37 °C b) 50 °C  
und c) der Anwesenheit von 40 % (v/v)  
DMF bei 37 °C.

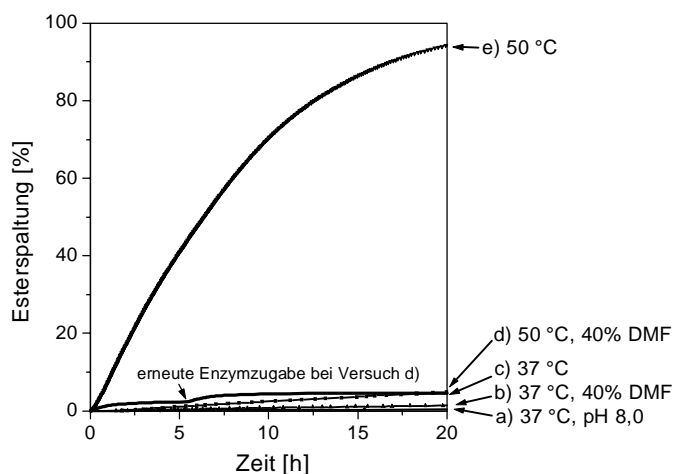


Tatsächlich konnte die Auflösegeschwindigkeit der Dodecandisäure in Gegenwart von 40 Vol-% DMF deutlich gesteigert werden (Abb. 4-38).

Die aus den vorherigen theoretischen Überlegungen abgeleitete, zu erwartende Beschleunigung der Auflösegeschwindigkeit durch den Zusatz des organischen Lösemittels DMF konnte zwar für die reine Dodecandisäure gezeigt werden. Eine schnellere enzymatische Hydrolyse des Polyesters SP 4/12 unter den gleichen Bedingungen (37 °C, 40 % DMF) ergab sich jedoch nicht (vgl. die Kurven b und c in Abb. 4-39).

Abb. 4-39:

Enzymatische Abbaukurve des Polyesters SP 4/12 mittels Lipase von *P. spezie* bei pH 7,0  
 a) bei einem erhöhten pH-Wert von 8,0 bzw. zur Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses in Gegenwart von 40 % (v/v) DMF bei b) 37 °C bzw. d) 50 °C (mit erneutem Enzymzusatz). Zum Vergleich ist die Abbaukurve ohne DMF-Zusatz bei c) 37 °C bzw. e) 50 °C gezeigt.



Bei 37 °C erfolgte auch in Gegenwart des Lösungsmittels DMF kein beschleunigter enzymatischer Abbau des Polyesters SP 4/12. Dieses entspricht der in dem vorherigen Kapitel 4.4.1.2.1 hergeleiteten These, daß die enzymatische Abbaugeschwindigkeit des vergleichsweise hoch schmelzenden Polyesters SP 4/12 bei der hohen Differenz von 40 °C zwischen der Kristallitschmelztemperatur ( $T_m = 72$  °C) und der Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}} = 37$  °C) durch die Abbaugeschwindigkeit der Kristallite limitiert wird.

Erst durch eine Annäherung der Meßtemperatur an die Polyesterschmelztemperatur wurde der enzymatische Abbau des Polyesters SP 4/12 beschleunigt. Der bei 50 °C ohne Lösungsmittelzusatz beobachtete Abbau des Polyesters SP 4/12, konnte jedoch in Gegenwart von DMF nicht reproduziert werden (vgl. die Kurven d und e in Abb. 4-39). In Gegenwart von DMF erreicht die Abbaukurve überraschender Weise nach einer geringen Anfangssteigung ein Plateau (s. Kurvenverlauf von Teilversuch d in Abb. 4-39). Über die Ursache kann nur spekuliert werden: Obwohl die Enzymaktivität bei 37 °C in Gegenwart von 40 % DMF kaum verkleinert war (Enzymaktivität in Gegenwart von DMF s. Abb. 4-8, Seite 27), könnte es bei der Meßtemperatur von 50 °C zu einer stärkeren Enzymdenaturierung gekommen sein.

Aus dem vorherigen Kapitel wird deutlich, daß für den biologischen Abbau der linearen Polyester die Temperaturdifferenz zwischen Kristallitschmelztemperatur und der Meßtemperatur einen wesentlichen Einfluß auf die Abbaugeschwindigkeit von teilkristallinen Polyestern hat. Um bestehende Abweichungen von dieser Korrelation zu erklären, wurde auf eine eventuelle thermodynamisch oder kinetisch bedingte Limitierung des Abbaus durch Anreicherung von Abbauprodukten an den Polyesteroberflächen untersucht. Aus den Ergebnissen der Versuche zur thermodynamischen Löslichkeit der Abbauprodukte, läßt sich auch für die langkettigen Säuren (mit der geringste Löslichkeit) eine Behinderung des Abbaus durch eine Überschreitung der thermodynamisch definierten Grenze der Löslichkeit ausschließen. Die experimentellen Daten zur Auflösegeschwindigkeit der reinen langkettigen Säuren (Neutralisationsgeschwindigkeit in der gleichen Größenordnung, wie die enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeiten) lassen vermuten, daß die Ablösungsgeschwindigkeit der Spaltprodukte von den Polyesteroberflächen bei Polyestern mit langkettigen Säuren einen geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Die aus den theoretischen Überlegungen abgeleitete zu erwartende Beschleunigung der Neutralisation durch den Zusatz von organischen Lösemitteln, konnte für die reine Säure gezeigt werden. Eine schnellere Hydrolyse des entsprechenden Polyesters unter den gleichen Bedingungen ergab sich jedoch nicht.

#### **4.4.2 Ausrichtung der Estergruppen entlang der Polymerkette**

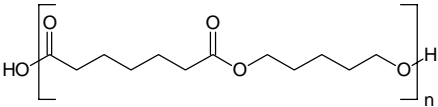
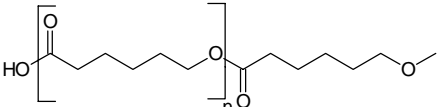
Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, daß bei strukturell ähnlichen aus Dicarbonsäuren und Dialkoholen aufgebauten Polyesterstrukturen die Abbaurate vorwiegend eine Funktion des temperaturabhängigen Abbaus der Kristallite ist und nicht durch unterschiedliche Substratspezifitäten der abbauenden Lipasen beeinflusst wird. Die Abbaugeschwindigkeit der Kristallite ist mit der Differenz zwischen Polymerschmelz- und Meßtemperatur korreliert.

Frühere Untersuchungen von KLEIN (1996) haben für zwei strukturell ähnliche Polyester sehr unterschiedliche Abbauraten gezeigt. KLEIN verglich den Polyester SP 5/7, ein Polykondensat aus dem Diol 1,5-Pentandiol und der Dicarbonsäure Pimelinsäure mit dem Polyester Polycaprolacton (PCL), der aus der Hydroxycarbonsäure 6-Hydroxyhexansäure als alleinigem Monomer aufgebaut ist. In beiden Strukturen liegen zwischen den Estergruppen fünf Kohlenstoffatome vor, wobei sich bei SP 5/7 im Gegensatz zu PCL stets die Ausrichtung der Esterbindung in der Kette abwechselt. Die Polyester unterschieden sich somit in der Ausrichtung der Estergruppen entlang der Polymerkette (Struktur der Polyester und

Meßdaten von KLEIN s. folgende Tab. 4-8). Hier stellt sich erneut die Frage, wie stark die Substratspezifität der verwendeten Lipase den Abbau determiniert?

KLEIN (1996) bestimmte die enzymatischen Abbauraten beider Polyester mittels einer Lipase von *Rhizopus delemar* bei 30 °C. Der Polyestern SP 5/7 mit der geringeren Schmelztemperatur ergab dabei eine 15-fach höhere Abbaurate als PCL (s. Meßdaten von KLEIN in Tab. 4-8). Trotz der generell unterschiedlichen Strukturen hinsichtlich der Estergruppen-Ausrichtung, konnte in eigenen enzymatischen Abbauuntersuchungen gezeigt werden, daß unter Anwendung des Konzeptes der Temperaturdifferenz zwischen Schmelz- und Meßtemperatur auch für diese unterschiedlichen Polyesterstrukturen vergleichbare Abbauraten erzielt werden (enzymatische Abbaukurven für PCL sind für verschiedene Meßtemperaturen in Abb. 8-11 auf Seite 167 dargestellt). So wurden die Polyester PCL und SP 5/7 in Gegenwart der Lipase von *P. spezieis* bei einer einheitlichen Temperaturdifferenz von 14 °C zwischen Schmelz- und Meßtemperatur ( $T_m - T_{\text{Meß}}$ ) mit vergleichbaren Abbauraten hydrolysiert (s. unterstrichene Werte in Tab. 4-8).

Tab. 4-8: Meßdaten zum enzymatischen Abbau von zwei Polyestern mit unterschiedlicher Ausrichtung der Estergruppen entlang der Polmerkette:  
Die Messungen wurden bei unterschiedlichen Meßtemperaturen ( $T_{\text{Meß}}$ ) durchgeführt.

Polyester	$T_m^{\text{a)}$ [°C]	$T_{\text{Meß}}$ [°C]	$T_m - T_{\text{Meß}}$ [°C]	Abbaurate	
				KLEIN 1996 <sup>b)</sup> [ $\mu\text{mol h}^{-1}(9,82 \text{ cm}^2)^{-1}$ ]	eigene Werte <sup>c)</sup> [ $\mu\text{mol h}^{-1}(2,54 \text{ cm}^2)^{-1}$ ]
SP 5/7 	44	30	<u>14</u>	3,7	<u>18</u>
PCL 	57	30	27	0,25	0,7
		40	17		6
		43	<u>14</u>		<u>29</u>
		48	9		46
		52	5		59

a) Mittels DSC-Messung bestimmtes Maximum des Kristallit-Schmelzbereiches (= Schmelzpunkt).

b) Lipase von *Rhizopus delemar*: 0,2  $\text{mg}_{\text{Feststoff}} \cdot \text{ml}^{-1}$ , Polymeroberfläche: 9,82  $\text{cm}^2$

c) Lipase von *P. spezieis*: 0,17  $\text{mg}_{\text{Feststoff}} \cdot \text{ml}^{-1}$  (0,091  $\text{mg}_{\text{Protein}} \cdot \text{ml}^{-1}$ ), Polymeroberfläche: 2,54  $\text{cm}^2$

Aus den Abbauergebnissen läßt sich ableiten, daß die Unterschiede in den enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeiten auch bei diesen strukturell unterschiedlichen Polyestern primär durch die Differenz zwischen Polyesterschmelzpunkt und Meßtemperatur determiniert sind.

Eine selektive Erkennung der Estergruppenausrichtung durch das Enzym erfolgt offenbar nicht, da bei vergleichbaren Temperaturdifferenzen ein annähernd gleiches Abbauverhalten erzielt wurde. Die höhere Schmelztemperatur des PCL im Vergleich zu SP 5/7 begründet sich mit der regelmäßigeren Anordnung der Estergruppen innerhalb der Polymerketten und der damit höheren intermolekularen elektrostatischen Wechselwirkungen.

#### 4.4.3 Kurzkettenverzweigte Polyester

Bei den bislang untersuchten linearen Polyestern nahm die Geschwindigkeit der enzymatischen Bindungsspaltung bei einer konstanten Meßtemperatur mit steigender Schmelztemperatur der Polyester ab. Ein wesentlicher Einfluß einer Substratspezifität der für den Abbau verwendeten Lipasen konnte nicht erkannt werden.

Durch den Einbau von Kurzkettenverzweigungen in die Hauptkette, wird im allgemeinen die räumliche Anordnung der Ketten aufgeweitet, so daß sich die zwischen den Ketten wirksamen Kräfte verringern und der Polyesterschmelzpunkt mit zunehmendem Verzweigungsgrad sinkt [VOLLMERT 1988, TIEKE 1997]. Sofern die enzymatische Abbaugeschwindigkeit primär eine Funktion der Temperaturdifferenz zwischen Polyester-schmelz- und Meßtemperatur ist, sollten Strukturen mit ataktischen Kurzkettenverzweigungen aufgrund der geringeren Schmelztemperaturen schneller hydrolysiert werden, als die analogen linearen Polyester.

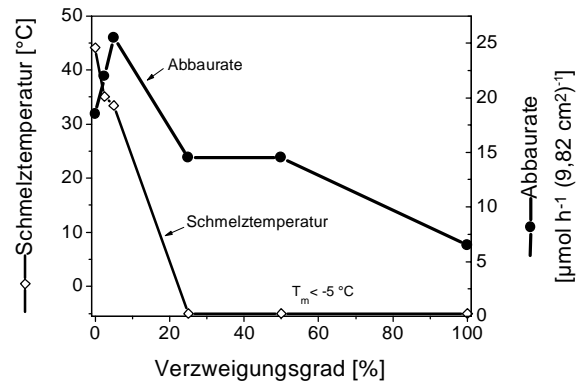
Diese Fragestellung läßt sich anhand einiger Daten von KLEIN (1996) diskutieren. Ausgehend von dem enzymatisch gut spaltbaren Polyester SP 3/6, synthetisierte KLEIN durch den teilweisen Austausch der Diolkomponente (1,3-Propandiol gegen das verzweigte 1,3-Butandiol) Methylseitengruppen-tragende Polyester (Struktur s. Abb. 4-41, Seite 67). Die enzymatischen Abbauraten wurden in Gegenwart der Lipase von *Rhizopus delemar* bei 30°C bestimmt (Abb. 4-40).

Die enzymatischen Abbauuntersuchungen von KLEIN zeigen mit steigendem Verzweigungsgrad zunächst einen Anstieg der Abbaugeschwindigkeiten. Oberhalb eines 5 %-igen Verzweigungsgrades sanken dann jedoch die Abbauraten kontinuierlich. Der Polyester mit dem 100 %-igen Verzweigungsgrad (vollständiger Austausch von 1,3-Propandiol gegen 1,3-Butandiol) ergab im Vergleich zum unverzweigten Polyester SP 3/6 (Verzweigungsgrad 0 %) eine um 60 % verringerte Abbaurate. Trotz ihrer geringen Schmelztemperaturen wurden die verzweigten Polyester nur sehr langsam enzymatisch hydrolysiert (bei einem Verzweigungsgrad von 2,5 % lag der Polyester als Wachs und oberhalb eines 25 %-igen Verzweigungsgrades als hochviskose Flüssigkeit vor).



Abb. 4-40:

Abbauraten mittels Lipase von *R. delemar* bei 30 °C und Polyesterschmelztemperaturen in Abhängigkeit vom Verzweigungsgrad kurzkettenverzweigter Polyestern. Die Messungen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von KLEIN (1996) durchgeführt.



Folglich besteht bei den kurzkettenverzweigten Polyestern kein direkter Zusammenhang zwischen der Abbaugeschwindigkeit und der Polyesterschmelztemperatur.

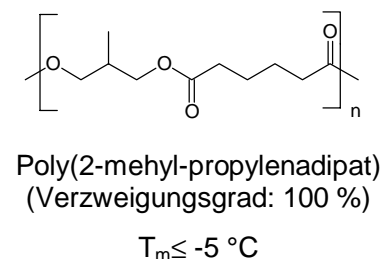
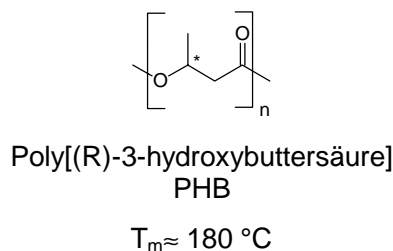
Im Vergleich zu den linearen Polyestern weisen die verzweigten Ketten eine größere mittlere Kettenbreite auf, was im allgemeinen die Kettenbeweglichkeit verringert [BATZER 1985]. Eine durch Methylseitengruppen verringerte Kettenbeweglichkeit wurde mittels kernmagnetischer Resonanzuntersuchungen (Festkörper  $^{13}\text{C}$ -NMR) auch für verzweigte Polydien gezeigt [BLUMENTHAL 1982].

Die verringerte Kettenflexibilität könnte durch sterische Behinderung den Einbau der Polyesterketten in das aktive Zentrum der Lipasen behindern, was die geringen Abbauraten erklärt.

Im Vergleich zu den oben beschriebenen synthetischen Polyestern, besitzt der bakterielle Polyester Poly[(R)-3-hydroxybuttersäure] (PHB) eine höhere Dichte an Verzweigungen entlang der Polyesterketten (Abb. 4-41).

Abb. 4-41:

Strukturvergleich von zwei kurzkettenverzweigten Polyestern.



Im Gegensatz zu den synthetisierten Polyestern sind die Methylseitengruppen bei PHB isotaktisch angeordnet (s. Markierung des asymmetrischen Kohlenstoffatoms der PHB-

Struktur in Abb. 4-41), woraus die hohe Kristallinität und der hohe Polyesterschmelzpunkt resultieren.

Unter den biologisch abbaubaren Polyestern nimmt das kurzkettenverzweigte Polyhydroxybutyrat PHB eine Sonderstellung ein. PHB ist der einzige hochschmelzende ( $T_m \approx 180\text{ °C}$ ) Polyester, für den ein biologischer Abbau (eingeleitet durch eine enzymatische Spaltung der Polyesterketten) nachgewiesen werden konnte und zwar nur mittels PHB-Depolymerasen, die auf diese verzweigte Struktur spezialisiert sind [TIMMINS et al. 1996].

Die Abbauergebnisse der synthetischen kurzkettenverzweigten Polyester ergaben mit zunehmendem Verzweigungsgrad sinkende Abbauraten trotz sinkender Schmelztemperaturen. Die durch die Seitenketten in ihrer Kettenbeweglichkeit eingeschränkten Polyester wurden langsamer enzymatisch abgebaut, als die analoge unverzweigte Struktur.

#### **4.4.4 Vernetzte Polyester**

Eine logische Fortführung der Strukturvariation von Polymeren zur Aufklärung von Struktur-Abbaubarkeits-Beziehungen stellt, über Verzweigungen hinaus, die Untersuchung von vernetzten Systemen dar.

Generell wird in der Literatur bei zunehmender Vernetzung eines Polymersystems von einer Abnahme der Abbaubarkeit bzw. der Abbaugeschwindigkeit berichtet [ALBERTSSON und EKLUND 1996, PALGREM et al. 1999, BAHARI et al. 1998]. Für diese Untersuchungen wurden aber in der Regel nur sehr grob charakterisierte Netzwerke verwendet, deren Synthese beispielsweise durch eine nachträgliche Vernetzung (mittels Bestrahlung) von hochmolekularen Polymeren [BAHARI et al. 1998] oder aber z.B. durch Eintopf-Polykondensationen unter Verwendung von mehrfunktionalen Monomeren (Reaktion von Diol und mehrfunktioneller Säure bzw. von Polyol und Dicarbonsäure) erfolgte [NAGATA et al. 1998 a, NAGATA et al. 1997 a, NAGATA et al. 1997 b und NAGATA et al. 1996]. Dadurch ergeben sich einerseits Probleme bei der Kontrolle der Homogenität der Netzwerke, andererseits bei der Herstellung geeigneter homogener Probekörper für reproduzierbare Abbauuntersuchungen.

In den hier vorgestellten Versuchen [WELZEL 1999] wird der Ansatz verfolgt, bioabbaubare aliphatische Präpolyester unterschiedlicher Kettenlängen mittels trifunktionaler Isocyanate in definierte Netzwerke zu überführen. Die charakterisierten Netzwerke wurden bezüglich ihrer enzymatischen Abbaubarkeit mit den linearen Polyestern verglichen.

Dazu wurden separat polykondensierte lineare Präpolyester im Molmassenbereich von

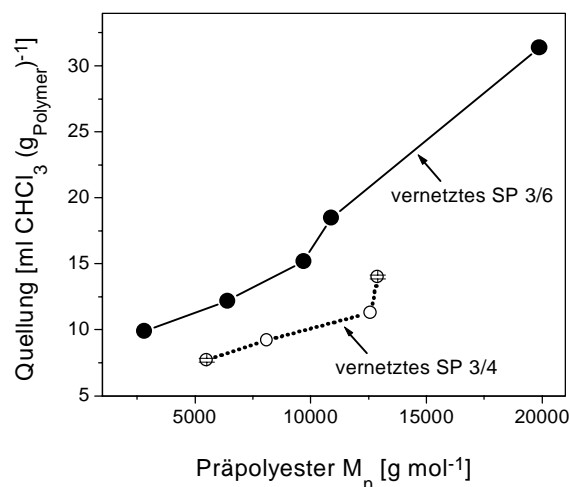
$M_n = 6000$  bis  $13000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (SP 3/4) bzw.  $M_n = 3000$  bis  $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  (SP 3/6) mittels Basonat HI, einem trifunktionalen Isocyanat (Struktur s. Abb. 6-4 auf Seite 133) zunächst vorvernetzt. Im einem zweiten (thermischen) Verfahrensschritt wurden die vorvernetzten Proben zu definierten Probefilmen endvernetzt. Der grundlegende Einfluß einer Einführung von Urethangruppen in die Polyesterstrukturen auf das Bioabbauverhalten wurde durch Abbauntersuchungen an entsprechenden unvernetzten Poly(ester)urethanen untersucht, zu deren Synthese die Präpolyester mit dem bifunktionalen Hexamethyldiisocyanat polyaddiert (kettenverlängert) wurden.

Charakteristische Daten der erzeugten Netzwerke wurden über die Bestimmung der Quellbarkeit in Chloroform sowie durch den extrahierbaren Anteil erhalten (Ergebnisse s. Tab. 8-2, Seite 167). Der nicht in das Netzwerk eingebundene Anteil an Präpolyestern und Vernetzern (= extrahierbarer Anteil) gibt Auskünfte über die Idealität der Netzwerke und wurde zur Optimierung der Vernetzungsprozesse verwendet.

Der Quellungsgrad der unlöslichen Netzwerkstrukturen charakterisiert die Netzbogenlänge, d.h. das Molekulargewicht zwischen zwei Vernetzungspunkten (Abb. 4-42).

Abb. 4-42:

Zunahme der Quellung in Abhängigkeit von der mittels GPC bestimmten Molmasse der Präpolyester (= Netzbogenlänge). Ein analoger Zusammenhang ergab der Austausch der mittels GPC bestimmten Molmassen gegen die über die Endgruppenbestimmung ermittelten Molmassen der Präpolyester (Molmassen s. Tab. 8-2, Seite 167).



Für die vernetzten Proben der Polyester SP 3/4 und SP 3/6 war für vergleichbare Netzbogenlängen ein vergleichbarer Quellungsgrad zu erwarten. Tatsächlich nahm die vernetzte Struktur des Polyesters SP 3/4 jedoch weniger Lösungsmittel auf (Abb. 4-42). Im Vergleich zu SP 3/6 ist SP 3/4 aufgrund der höheren Konzentration an polaren Estergruppen polarer und quillt folglich in dem hydrophoben Lösungsmittel Chloroform weniger stark als SP 3/6.

Die Reproduzierbarkeit der Herstellungsmethode der vernetzten Polyester konnte durch Quellungsmessungen der Netzwerke gezeigt werden. Die in jeweils drei unabhängigen Synthesen hergestellten vernetzten Proben zweier verschiedener Präpolyester (SP 3/4:  $\bar{M}_n =$

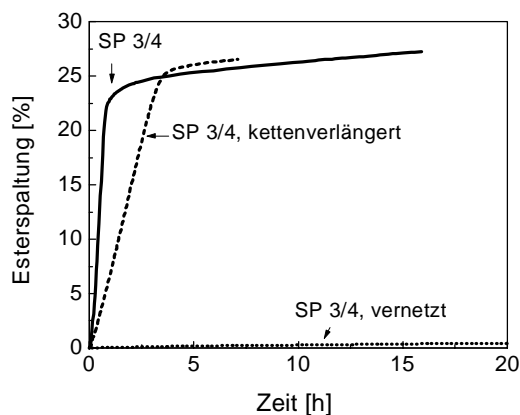
5500 bzw. 12900 g·mol<sup>-1</sup>) ergaben nur geringe Unterschiede in den Quellungsgraden ( $7,7 \pm 0,15 \text{ ml}_{\text{CHCl}_3} \cdot \text{g}_{\text{Polyester}}$  bzw.  $14,0 \pm 0,15 \text{ ml}_{\text{CHCl}_3} \cdot \text{g}_{\text{Polyester}}$ ).

Durch die Fixierung der Polyesterendgruppen in dem dreidimensionalen Netzwerk, wurde die enzymatische Abbaubarkeit der Polyester drastisch gesenkt, was in Abb. 4-43 exemplarisch für eine vernetzte Struktur des SP 3/4 gezeigt ist.

Abb. 4-43:

Abbaukurven eines kettenverlängerten ( $T_m = 42^\circ\text{C}$ ) und eines vernetzten Polyesters im Vergleich zu der Abbaukurve des Präpolyesters SP 3/4 ( $T_m = 50^\circ\text{C}$ ) mittels Lipase von *P. spezie* bei  $37^\circ\text{C}$ .

Die Messungen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von WELZEL (1999) durchgeführt.



Schon die Einführung der chemisch von den Esterbindungen abweichenden Urethanbindungen verringert die enzymatische Abbaugeschwindigkeit der Polyesterketten (s. kettenverlängertes SP 3/4 in Abb. 4-43). Im Vergleich zu dem reinen Präpolyester SP 3/4 wurde der kettenverlängerte Polyester trotz seines geringeren Schmelzpunktes (Urethan-kettenverlängert:  $T_m = 42^\circ\text{C}$ ; sonst  $T_m = 50^\circ\text{C}$ ) langsamer enzymatisch hydrolysiert.

Zu einer wesentlich stärkeren Verlangsamung der Abbaugeschwindigkeit kam es durch den Einbau der Polyesterketten in das Netzwerk (Abb. 4-43). Innerhalb von 20 Stunden wurden nur maximal 3 % der Esterbindungen hydrolysiert. Worin ist dieser langsame Abbau begründet? Die Kettenenden sind aufgrund ihrer Vernetzungen nicht für einen Abbau (Exo-Spaltung) zugänglich. Der enzymatische Endo-Abbau setzt Kettenschlaufen („Loops“) von mindestens 4 bis 5 Repetiereinheiten (SP 3/6) voraus, die in den trogförmigen Zugangsbereich der Lipase bis zum aktiven Zentrum reichen. Die untersuchten Netzwerke enthielten je nach Präpolymermasse Netzbögen von 15 bis 107 Repetiereinheiten (Molmassen der SP 3/6-Präpolyester von  $M_n = 2800$  bis  $19900 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), die für eine enzymatische Spaltung hinreichend lang sein sollten.

Die dennoch geringen Abbauraten lassen sich vermutlich mit den durch die Netzstruktur stark eingeschränkten Kettenbeweglichkeit und -mobilität erklären, wodurch das Eindringen

der Ketten in den trogförmigen Zugangsbereich und das Einpassen der Ketten in das aktive Zentrum behindert wurden.

Mit zunehmender Netzbogenlänge wird das Netzwerk insgesamt weitmaschiger. Die mit der Netzbogenlänge steigende Kettenbeweglichkeit und -mobilität sollte den enzymatischen Abbau beschleunigen. Tatsächlich stiegen die Abbaugeschwindigkeiten jedoch nur in Kompost ( $T_{\text{Meß}} = 55^\circ\text{C}$ ) mit zunehmender Netzbogenlänge (s. rechtes Bild in Abb. 4-44). In den bei nur  $40^\circ\text{C}$  durchgeführten enzymatischen Abbauuntersuchungen sanken die Abbauraten hingegen mit zunehmender Präpolyesterkettenlänge (s. linkes Bild in Abb. 4-44).

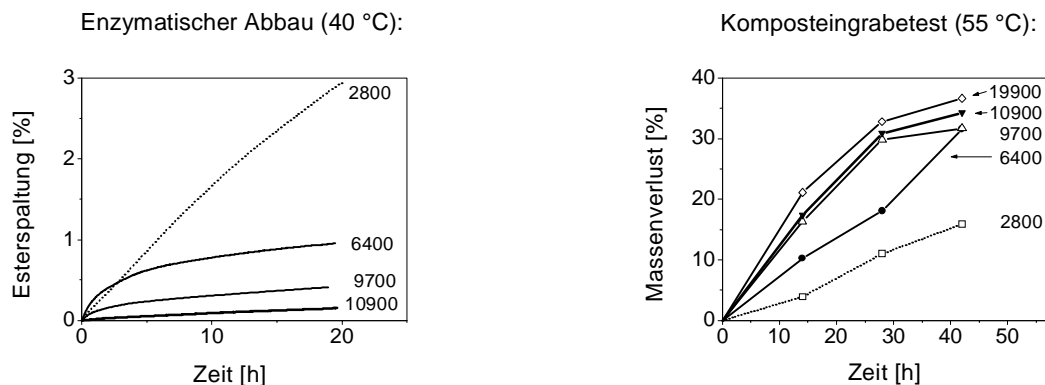


Abb. 4-44: Zeitabhängige Abbaukurven von vernetztem SP 3/6 mittels Lipase von *P. spezie* bei  $40^\circ\text{C}$  (links) bzw. in Kompost bei  $55^\circ\text{C}$  (rechts). An den Kurven sind die Molmassen ( $\bar{M}_n$ ) der jeweiligen Präpolyester (= Netzbogenlänge) angegeben. Die Messungen wurden im Rahmen der Diplomarbeit von WELZEL (1999) durchgeführt.

Diese unterschiedlichen Tendenzen müssen im Zusammenhang mit der von der Umgebungstemperatur abhängigen Kristallitstruktur der vernetzten Polyester interpretiert werden. Auch innerhalb der Netzwerke bildeten sich mit zunehmender Netzbogenlänge kristalline Domänen aus, die bei Temperaturen von  $36$  bis  $40^\circ\text{C}$  schmelzen [WELZEL 1999].

Sofern die Abbauuntersuchungen bei Meßtemperaturen durchgeführt, die unterhalb der Kristallitschmelztemperaturen lagen, wiesen die vernetzten Polyester Kristallite auf. Entsprechend der durch Kristallite verringerten Abbauraten der linearen aliphatischen Homopolyester (vgl. Kapitel 4.4.1.2.1), wird auch die Abbaugeschwindigkeit der vernetzten teilkristallinen Polyester bei  $40^\circ\text{C}$  nicht nur die Netzstruktur reduziert, sondern darüber hinaus auch durch die Anwesenheit der Kristallite.

Im Gegensatz zu den bei nur  $40^\circ\text{C}$  durchgeführten Abbauuntersuchungen stiegen bei  $50^\circ\text{C}$

(in Kompost) die Abbaugeschwindigkeiten mit zunehmender Netzbogenlänge. Bei dieser Temperatur, die oberhalb der Kristallitschmelztemperatur lag, stieg die Abbaugeschwindigkeit mit zunehmender Kettenbeweglichkeit und –mobilität.

Außerdem könnte mit zunehmender Netzbogenlänge das Eindringen der Enzyme in die amorphen Netzwerke prinzipiell erleichtert werden. Der Durchmesser der Lipase von *P. spezies* berechnet sich gemäß Formel (4-3) nach TONFORD (1961) (gelelektrophoretisch ermittelten Molekulargewichtes  $M = 30000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) mit  $45 \text{ \AA}$  ( $= 4,5 \text{ nm}$ ).

$$R = 0,72 \cdot M^{\frac{1}{3}} \quad (4-3)$$

$R =$  Radius eines globulären Proteins [ $\text{\AA}$ ]

$M =$  Molekulargewicht [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]

Damit liegt der Enzymdurchmesser unterhalb der Netzbogenlängen (minimal  $22 \text{ nm}$  bei  $M_n (\text{SP } 3/6) = 2800 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  bzw. maximal  $158 \text{ nm}$  bei  $M_n (\text{SP } 3/6) = 19900 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Vorausgesetzt der Abstand zwischen den Polyesterketten ist ausreichend ist das Eindringen der Lipase in die Netzstrukturen prinzipiell möglich (Abb. 4-45).

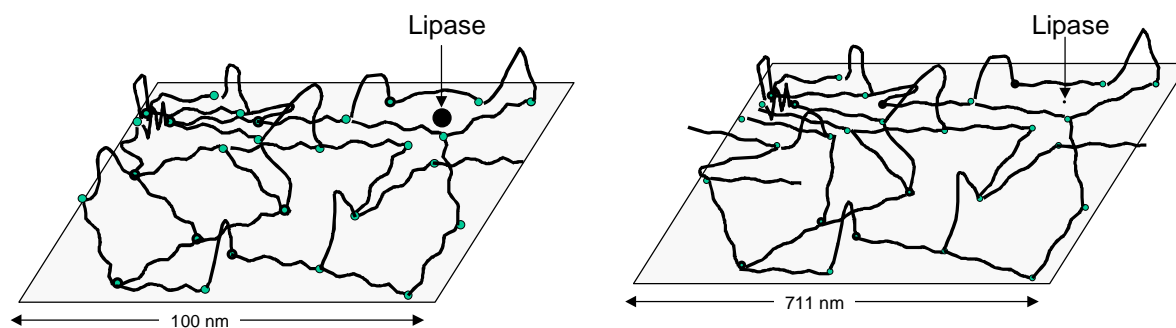


Abb. 4-45: Schematischer Größenvergleich der Lipase von *P. spezies* ( $M \approx 30000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ , Durchmesser  $4,5 \text{ nm}$ ) mit der Maschengröße zweier Netzwerke unterschiedlicher Netzbogenlängen ( $M_n \text{ SP3/6-Präpolyester} = 2800 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) (links) bzw. ( $M_n \text{ SP3/6-Präpolyester} = 19900 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) (rechts). Die Vernetzung der Ketten erfolgte über ein trifunktionelles Isocyanat.

Da Enzyme jedoch auch nicht in Polyesterfilme linearer Polyester eindringen, sondern der enzymatische Abbau an der Polymeroberfläche stattfindet, ist auch für die vernetzten Polyesterfilme das Eindringen der Enzyme unwahrscheinlich.

BAHARI et al. (1998) zeigte auch für eine vernetzte Polyesterstruktur oberflächenabhängige Abbauraten. Dabei variierte BAHARI bei dem Polyester SP 4/4 nicht die Netzbogenlängen, sondern die Porengröße durch Treibmittelzusatz während des Vernetzungsvorganges. Die vernetzte Struktur von SP 4/4 wurde sogar schneller enzymatisch hydrolysiert (Lipase AK), als der unvernetzte nicht aufgeschäumte Polyester.

Die enzymatischen Abbauuntersuchungen der vernetzten Polyester zeigen, daß die in dreidimensionale Netzwerke eingebundenen aliphatischen Polyesterketten deutlich langsamer enzymatisch hydrolysiert werden, als im unvernetzten Zustand.

## 4.5 Aliphatisch-aromatische Copolyester

Die technisch genutzten aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester zeichnen sich aufgrund ihrer Herstellungsweise (Schmelzkondensation) durch eine statistische Verteilung der aliphatischen und aromatischen Sequenzen innerhalb der Polymerkette aus (s. linker Teil in Abb. 4-46).

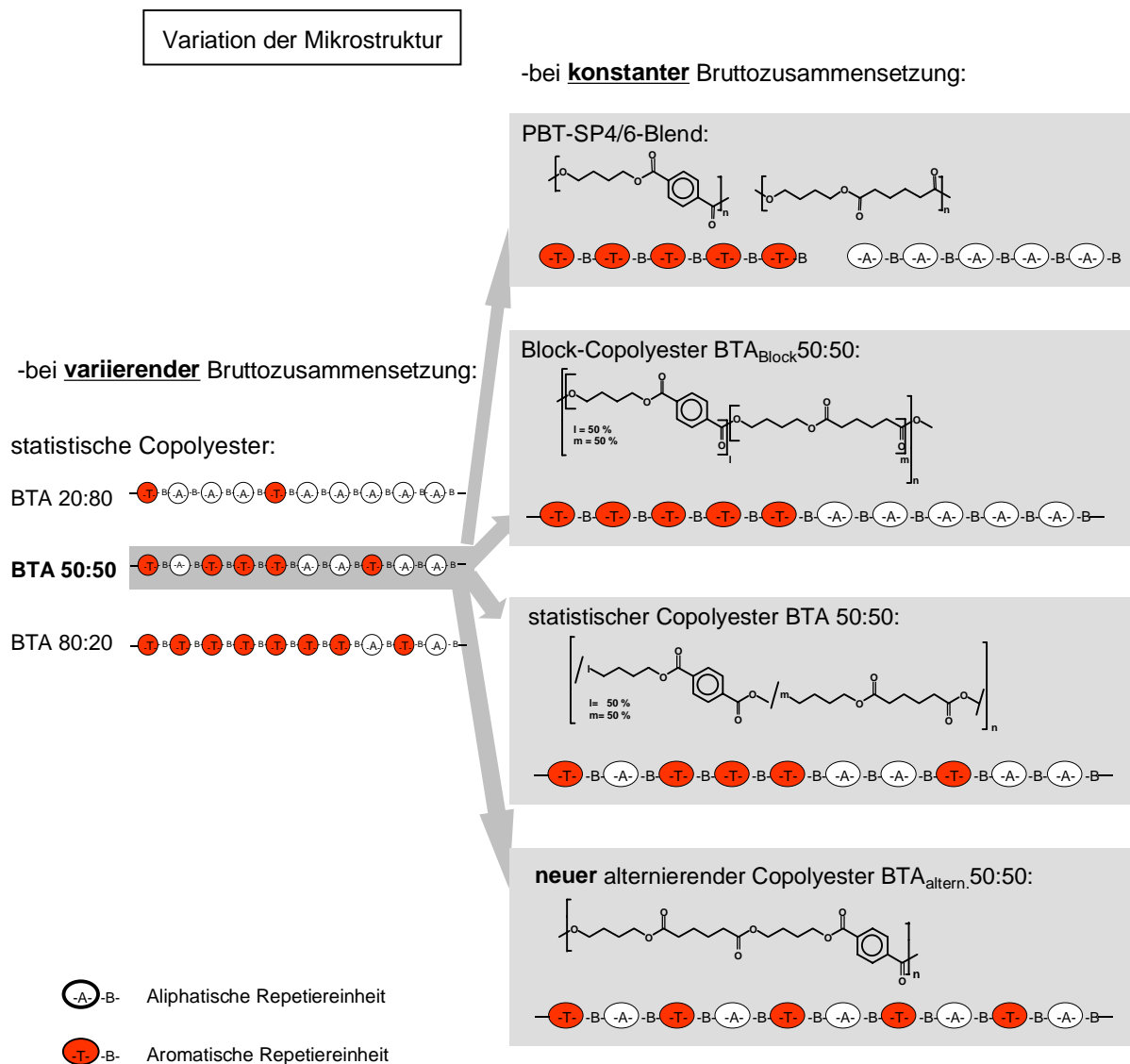


Abb. 4-46: Variation der Mikrostrukturen von aliphatisch-aromatischen Mischpolyestern aus Adipinsäure (A), 1,4-Butandiol (B) und Terephthalsäure (T) mit einer variierenden Bruttozusammensetzung (links) bzw. mit einer konstanten Bruttozusammensetzung (rechts).



Frühere Untersuchungen zum biologischen Abbau dieser statistischen BTA-Copolyester ergaben mit steigendem Terephthalsäureanteil sinkende Abbauraten [WITT 1996, VAN DER ZEE 1997]. Da technische Copolyester, wie die statistischen BTA-Copolyester eine breite Sequenzlängenverteilung besitzen, sind Ergebnisse von Bioabbauversuchen in aller Regel nur schwer interpretierbar, was systematische Untersuchungen zu Struktur-Abbau-Beziehungen nahezu unmöglich macht. Um den Einfluß der aliphatischen und aromatischen Sequenzlängen auf die enzymatische Abbaugeschwindigkeit von BTA-Copolyestern zu klären, wurden Copolyester mit einer konstanten Bruttozusammensetzung (50 % Terephthalsäure am Gesamtsäureanteil) aber unterschiedlichen mittleren Sequenzlängen synthetisiert (s. rechten Teil von Abb. 4-46).

## 4.5.1 Charakterisierung der Copolyester

### 4.5.1.1 Charakterisierung der Mikrostruktur

#### 4.5.1.1.1 Sequenzlängenberechnung von statistischen Copolyestern

Für statistische Copolyester ist eine Berechnung der Monomerverteilung in der Polyesterkette aufgrund statistischer Überlegungen möglich [VOLLMERT 1988]. Die Wahrscheinlichkeit  $W_{A(n)}$  für das Vorhandensein einer Sequenz mit  $n$  aufeinanderfolgenden aliphatischen bzw. aromatischen Wiederholungseinheiten (= Repetiereinheiten), berechnet sich gemäß der Gleichungen (4-4) bzw. (4-5).

$$W_{A(n)} = \left( \frac{r_A[A]}{r_A[A] + [T]} \right)^{n-1} \cdot \left( \frac{[T]}{r_A[A] + [T]} \right) \quad (4-4)$$

$$W_{T(n)} = \left( \frac{r_T[T]}{r_T[T] + [A]} \right)^{n-1} \cdot \left( \frac{[A]}{r_T[T] + [A]} \right) \quad (4-5)$$

- $W_{A(n)}$  bzw.  $W_{T(n)}$  = Zahlenanteil der aliphatischen (A) bzw. aromatischen (T) Sequenzen mit der Sequenzlänge  $n$
- $[A]$  bzw.  $[T]$  = Stoffmengenanteil von Adipinsäure bzw. Terephthalsäure im Reaktionsgemisch [mol-%]
- $n$  = Sequenzlänge = Anzahl der in der Kette unmittelbar aufeinanderfolgenden Struktureinheiten derselben Art (Repetiereinheiten)
- $r_A, r_T$  = Copolymerisationsparameter, der im Fall der idealen Copolymerisation  $r = 1$  ist

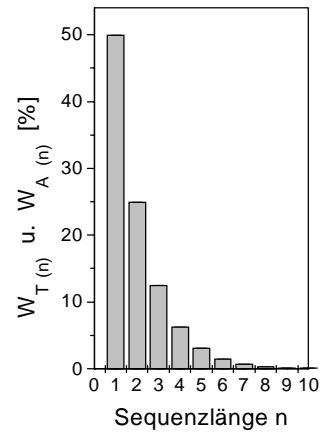
In dem statistischen Copolyester BTA 50:50 mit dem 50 %-igen Terephthalsäureanteil liegen beispielsweise 25 % der Terephthalsäuremoleküle in Zweier- Sequenzen vor (4-6).

$$W_{T(2)} = \left( \frac{0,5}{0,5 + 0,5} \right)^{2-1} \cdot \left( \frac{0,5}{0,5 + 0,5} \right) = 0,25 \Rightarrow 25\% \quad (4-6)$$

Allgemein nimmt die Wahrscheinlichkeit für das Vorkommen längerer aromatischer und auch aliphatischer Sequenzen mit zunehmender Sequenzlänge ab, was in Abb. 4-47 exemplarisch für den BTA-Copolyester mit 50 mol-% Terephthalsäure gezeigt ist. Von insgesamt 100 aromatischen Sequenzen liegen in den Molekülkette 50 Einer-, 25 Zweier-, 12 Dreier- und nur noch 6 Vierersequenzen vor.

Abb. 4-47:

Abnahme der Wahrscheinlichkeit des Vorkommens längerer aromatischer und aliphatischer Sequenzen im statistischen BTA-Copolyester mit 50 mol-% Terephthalsäure (BTA 50:50).



Die Summe der Produkte aus Wahrscheinlichkeit  $W_{T(n)}$  bzw.  $W_{A(n)}$  und der jeweiligen Sequenzlänge  $n$  ergibt gemäß Gleichungen (4-7) bzw. (4-8) die mittlere aliphatische bzw. aromatische Sequenzlänge  $\overline{SL}_A$  bzw.  $\overline{SL}_T$ .

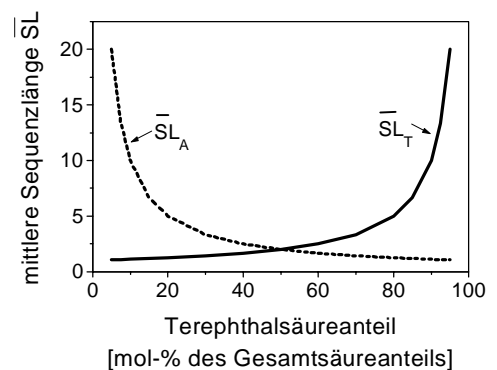
$$\overline{SL}_A = \sum_n W_{A(n)} \cdot n \quad (4-7)$$

$$\overline{SL}_T = \sum_n W_{T(n)} \cdot n \quad (4-8)$$

Bei den statistischen BTA-Copolyestern nimmt mit zunehmendem Terephthalsäureanteil die mittlere aromatische Sequenzlänge  $\overline{SL}_T$  zu, während die mittlere aliphatische Sequenzlänge  $\overline{SL}_A$  sinkt (Abb. 4-48).

Abb. 4-48:

Zunahme der mittleren aromatischen Sequenzlänge  $\overline{SL}_T$  und Abnahme der mittleren aliphatischen Sequenzlänge  $\overline{SL}_A$  mit zunehmendem Terephthalsäureanteil bei statistischen BTA-Copolyestern.



So ist z.B. der statistische Copolyester BTA 50:50 aus aromatischen und aliphatischen Sequenzen gleicher mittlerer Länge aufgebaut ( $\overline{SL}_T = \overline{SL}_A = 2$ ). Das entspricht einer Kette mit alternierenden Zweier-Struktureinheiten -A-A-T-T-A-A-T-T-A-A-T-T-A-A-T-T-. Tatsächlich ist die Struktur eines statistischen Copolymerisates jedoch deutlich von dieser regelmäßigen

alternierenden Anordnung verschieden und es liegen, wie in der Abb. 4-47 gezeigt, auch Einer-, Zweier-, Dreier- und längere Sequenzen vor.

Für die in den Abbauuntersuchungen eingesetzten statistischen BTA-Copolyestern sind in der Tab. 4-9 die berechneten mittleren Sequenzlängen aufgeführt und mit den durch NMR-Spektroskopie (s. nächstes Kapitel 4.5.1.1.2) ermittelten Werten verglichen.

Tab. 4-9: Berechnete Werte für die mittleren aromatischen und aliphatischen Sequenzlängen ( $\overline{SL}_T$  und  $\overline{SL}_A$ ) von statistischen BTA-Copolyestern im Vergleich zu den mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie ermittelten Werten:

Ausgangs- konzentration (gemäß Stöchiometrie)  $M_T:M_A$ [mol-%]	Molmasse <sup>a)</sup>  $M_w$ [g·mol <sup>-1</sup> ]	Mittlere Sequenzlängen berechnet <sup>b)</sup>   gemessen <sup>c)</sup>				Polyester- <sup>c)</sup> zusammensetzung (gemäß $^{13}\text{C}$ -NMR)  $M_T:M_A$ [mol-%]
		$\overline{SL}_T$	$\overline{SL}_A$	$\overline{SL}_T$	$\overline{SL}_A$	
32:68 <sup>d)</sup>	44300	1,5	3,1	1,5	3,2	31:69
40:60 <sup>d)</sup>	56100	1,7	2,5	1,7	2,5	39:61
50:50	51000	2,0	2,0	2,0	2,0	50:50
67:32	20100	3,0	1,5	2,8	1,6	67:32

a) GPC-Messung mit Polystyrol als Standard.

b) Berechnung gemäß Gleichung (4-7) und (4-8).

c)  $^{13}\text{C}$ -NMR-Meßdaten gemäß Kapitel 4.5.1.1.2.

d) Material und Meßdaten von WITT (1996).

Gemäß der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Daten lagen die Terephthalsäureanteile der Kondensationsprodukte teilweise unterhalb (bis zu 3 %) der für die Polykondensation eingesetzten Ausgangskonzentrationen. Die Ursache dafür liegt in einem Terephthalsäureverlust aus dem Reaktionsgemisch durch Sublimation während der Kondensation, was zu der nachweisbaren Änderung der stöchiometrischen Zusammensetzung führte.

#### 4.5.1.1.2 Sequenzlängenbestimmung mittels $^{13}\text{C}$ -NMR

Die hochauflösende  $^{13}\text{C}$ -kernmagnetische Resonanzspektroskopie ( $^{13}\text{C}$ -NMR) ermöglicht die Bestimmung der mittleren Sequenzlängen, die nachfolgend am Beispiel des statistischen Copolyesters BTA 50:50 erläutert wird.

Als Lösungsmittel wurde deuterierte Trifluoressigsäure (TFA) eingesetzt, die aufgrund ihrer hohen Polarität geeignet war, auch die in Chloroform nur schwer löslichen Block-Copolyester und den PBT-SP4/6-Blend vollständig in Lösung zu bringen. Allerdings zeigen in Trifluoressigsäure vermessene Proben breitere Signale als in Chloroform, was auf ein ungünstigeres Signal-Rausch-Verhältnis zurückzuführen ist.

Das für BTA 50:50 ermittelte  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum zeigt Abb. 4-49.

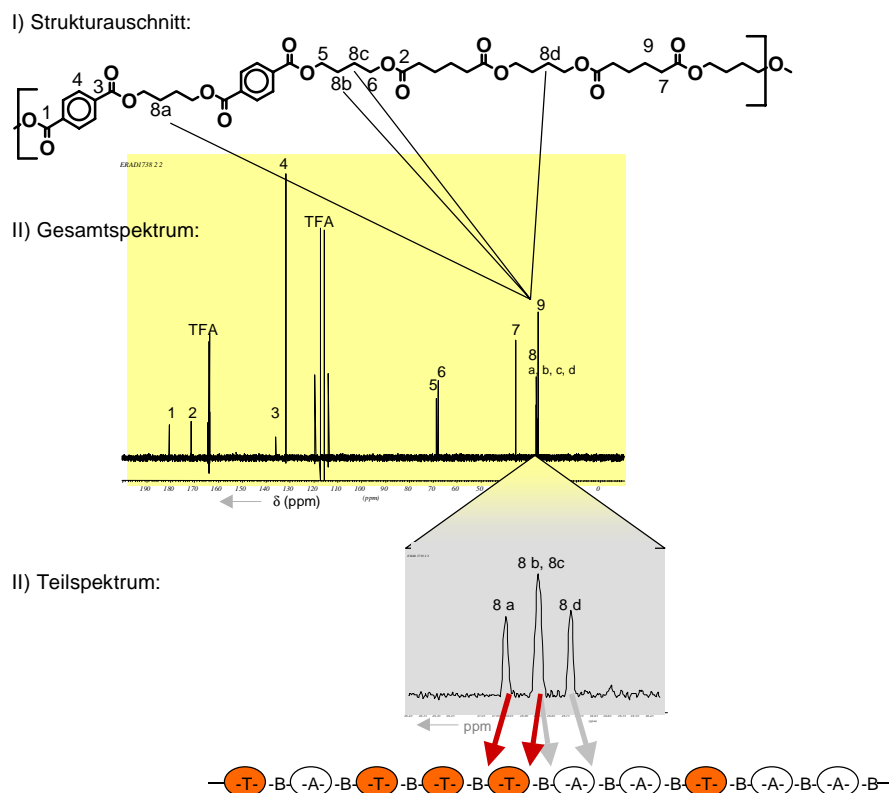


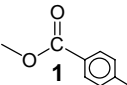
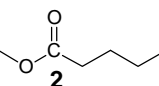


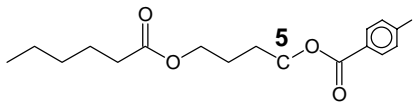
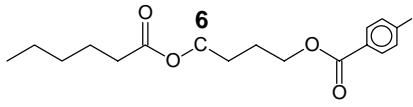
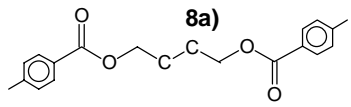
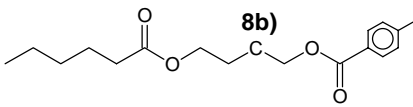
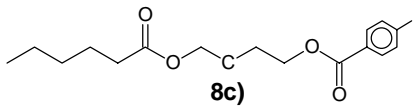
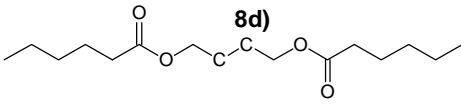
Abb. 4-49: Zuordnung der Signale des  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektrums des statistischen Copolyesters BTA 50:50 in deuterierter Trifluoressigsäure, wobei der Bereich von 26,2 bis 27,1 ppm gespreizt dargestellt ist. Bezüglich der Signalzuordnungen s. auch Tab. 4-10.

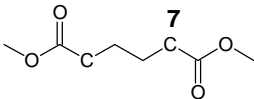
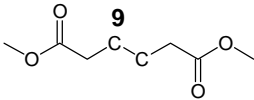
Die Bestimmung der mittleren Sequenzlängen erfolgte auf der Basis des Signals Nr. 8, das den zwei mittleren Kohlenstoffatomen der Tetramethyleinheit der Polyesterketten zuzuordnen ist (s. Abb. 4-49 I). Nach Spreizung der Abzisse ist eine Aufspaltung dieses Signals in Abhängigkeit von der chemischen Umgebung in vier Einzelsignale zu erkennen (Abb. 4-49 III, Signal 8 a bis 8 d). Das linke Signal mit der höchsten chemischen Verschiebung (Signal 8 a) entspricht einer ausschließlich aromatischen Kettenumgebung. Die kleinste chemische Verschiebung (Signal 8 d) entspricht den C-Atomen der Tetramethyleinheit, die beidseitig mit Adipinsäure verknüpft sind. Das mittlere Signal (8 b, 8 c) ist Tetramethyleinheiten zuzuordnen, die mit Adipinsäure und Terephthalsäure verbunden sind. In Chloroform als Lösungsmitteln wird dieses Signal aufgrund des günstigeren Signal-Rauschverhältnisses aufgespalten (vgl. Abb. 4-50, Seite 82).

Der im oberen Teil der Abb. 4-49 dargestellte Ausschnitt einer Polymerkette zeigt die

Zuordnung aller Signale des  $^{13}\text{C}$ -NMR Gesamtspektrums. Die genauen Werte der chemischen Verschiebungen und die entsprechenden Teilstrukturen sind in Tab. 4-10 tabellarisch aufgeführt, wobei das betreffende Kohlenstoffatom in der Teilstruktur beziffert ist.

Tab. 4-10:  $^{13}\text{C}$ -NMR Signalzuordnung des statistischen Copolyesters BTA 50:50 in deuterierter Trifluoressigsäure.

Kohlenstoffatom	Teilstruktur mit jeweiligem Kohlenstoffatom <sup>a)</sup>	$^{13}\text{C}$ -Verschiebung $\delta$ -Werte [ppm]
Carbonyl-kohlenstoff:		180,5
		171,2
Aromaten-kohlenstoff:		135,8
		131,8
Tetramethylen glycol-kohlenstoff:		68,7
		67,9
		26,76
		26,65
		26,65
		26,52

Kohlenstoff-atom	Teilstruktur mit jeweiligem Kohlenstoffatom <sup>a)</sup>	<sup>13</sup> C-Verschiebung $\delta$ -Werte [ppm]
Adipat-kohlenstoff:		35,7
		26,0

<sup>a)</sup> Die angegebenen Ziffern beziehen sich auf die Signalzuordnung des <sup>13</sup>C-NMRGesamtspektrums in Abb. 4-49 I.

Durch Integration der Signale Nr. 8 a bis d wurden gemäß Gleichung (4-9) bis (4-13) die molare Copolyesterzusammensetzung ( $M_A$  bzw.  $M_T$ ), die mittlere aromatische und aliphatische Sequenzlänge ( $\overline{SL}_T$  bzw.  $\overline{SL}_A$ ) sowie der Unordnungsgrad ( $U_R$ ) berechnet [GILDING und REED 1979, YAMADERA und MURANO 1967].

$$M_T = \frac{a+b}{a+b+c+d} \cdot 100\% \quad M_A = \frac{c+d}{a+b+c+d} \cdot 100\% \quad (4-9), (4-10)$$

$M_T$ = Molarer Terephthalsäureanteil [mol-%]

$M_A$ = Molarer Adipinsäureanteil [mol-%]

a, b, c, d= Integral der Signale Nr. 8a bis d im <sup>13</sup>CNMR-Spektrum (vgl. S. 79)

Die mittleren aromatischen und aliphatischen Sequenzlängen ( $\overline{SL}_T$  bzw.  $\overline{SL}_A$ ) können gemäß Gleichungen (4-11) und (4-12) berechnet werden.

$$\overline{SL}_T = \frac{a}{b} + 1 \quad \overline{SL}_A = \frac{d}{c} + 1 \quad (4-11), (4-12)$$

Der Unordnungsgrad  $U_R$  (4-13) zeigt inwieweit eine völlig ungeordnete, ideal statistische Struktur ( $U_R = 1$ ) bzw. eine regelmäßige Sequenzabfolge ( $U_R = 0$ ) vorliegt.

$$U_R = \frac{1}{\overline{SL}_A} + \frac{1}{\overline{SL}_T} \quad (4-13)$$

Im Gegensatz zu den statistischen Copolyestern, die in der Schmelze aus 1,4-Butandiol, Adipinsäure und Terephthalsäure kondensiert wurden, war für die Herstellung der Copolyester mit alternierender Mikrostruktur der Einsatz von vorkondensierten

alkoholterminierten aromatischen Sequenzen (Strukturformel s. Tab. 4-4, Seite 34) erforderlich.

Erste Versuche zur Herstellung des alternierenden Copolyesters  $\text{BTA}_{\text{altern. 50:50}}$  wurden in der Schmelze unter Zusatz eines Veresterungskatalysators (p-Toluolsulfonsäure) durchgeführt. Diese Methode erwies sich jedoch als ungeeignet, da es schon nach kurzer Reaktionszeit bei einer vergleichsweise geringer Molmasse des Kondensationsproduktes zu Umesterungen unter Störung der alternierenden Sequenzabfolge kam (vgl. Abb. 4-50 b). Bei dem Produkt waren 20 % der Terephthalsäure und 27 % der Adipinsäure in längeren Sequenzen ( $\overline{\text{SL}}_{\text{T}} , \overline{\text{SL}}_{\text{A}} > 1$ ) eingebaut (s. Tab. 4-11 auf Seite 83).

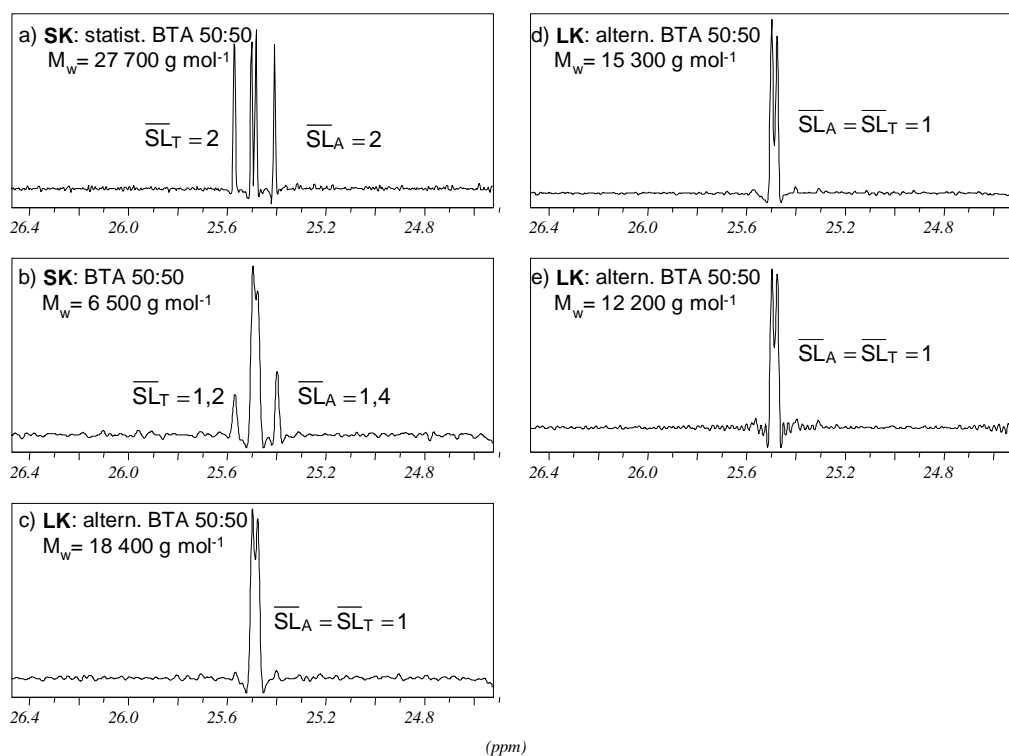


Abb. 4-50:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren zur Synthese des alternierenden Copolyesters  $\text{BTA}_{\text{altern. 50:50}}$ : Die Polyester a) und b) wurden durch Schmelzkondensation (SK), die Ansätze c) bis e) mittels Lösungskondensation (LK) polykondensiert. Als Edukte wurden für Ansatz a) 1,4-Butandiol, Terephthalsäure und Adipinsäure bei den Ansätzen b) bis e) die aromatische Einer-Sequenz und Adipinsäure eingesetzt.  $\overline{\text{SL}}_{\text{T}}$  bzw.  $\overline{\text{SL}}_{\text{A}}$  geben die zahlenmittleren Längen der aromatischen bzw. aliphatischen Sequenzen an. (Lösungsmittel: deuteriertes Chloroform, Spreizung im Bereich der zwei mittleren Kohlenstoffatome des Tetramethylenglycols).

Erst durch Lösungskondensation unter Verwendung von Toluol als inertem Lösungsmittel und p-Toluolsulfonsäure als Veresterungskatalysator gelang die Herstellung der



alternierenden Copolyesterstrukturen. Unabhängig von den Produktmolmassen ergaben sich reproduzierbar die für den alternierenden Copolyester zu erwartenden mittleren Sequenzlängen von  $\overline{SL}_A = \overline{SL}_T = 1$  (Abb. 4-50 c, d, e). Die Struktur war überwiegend aus aromatischen und aliphatischen Sequenzen der Länge  $\overline{SL}_A = \overline{SL}_T = 1$  aufgebaut (Tab. 4-11). Nur etwa 2 bzw. 4 % Adipinsäure bzw. Terephthalsäure lagen in längeren aliphatischen bzw. aromatischen Sequenzen ( $\overline{SL}_A, \overline{SL}_T > 1$ ) vor.

Tab. 4-11:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Meßdaten von Produkten der Schmelzkondensation SK und der Lösungskondensation LK zur Herstellung eines alternierenden Copolyesters  $\text{BTA}_{\text{altern.50:50}}$ : Neben dem prozentualen Stoffmengenanteil an Terephthalsäure- und Adipinsäure ( $M_T$  und  $M_A$ ) sind die mittleren aromatischen und aliphatischen Sequenzlängen ( $\overline{SL}_T$  und  $\overline{SL}_A$ ) sowie der Unordnungsgrad  $U_R$  angegeben.

Synthese- bedingung	Molmasse $M_w^{\text{a)}}$ [g·mol $^{-1}$ ]	Polyester- Zusammensetzung $M_T: M_A$ [mol-%]	Mittlere Sequenzlänge		Unord- nung $U_R$
			$\overline{SL}_T$	$\overline{SL}_A$	
SK <sup>b)</sup>	6500	48: 52	1,3	1,4	1,5
LK <sup>c)</sup>	18400	50: 50	1,0	1,0	2,0
LK <sup>c)</sup>	15300	50: 50	1,0	1,0	1,9
LK <sup>c)</sup>	12200	50: 50	1,0	1,0	1,9

a) GPC-Messung mit Polystyrol als Standard.

b) Kondensation der aromatischen Einer-Sequenz mit Adipinsäure in der Schmelze.

c) Kondensation der aromatischen Einer-Sequenz mit Adipinsäure in Lösung.

Um längere aliphatische und aromatische Sequenzlängen zu realisieren, erfolgte die Synthese von Block-Copolyestern und eines PBT-SP4/6-Blends.

Der PBT-SP4/6-Blend repräsentiert „maximale Sequenzlängen“, wobei die Sequenzen jedoch im Gegensatz zu den Copolyestern nicht kovalent verbunden sind (Synthese erfolgte durch Zusammenschmelzen der Homopolyester ohne Zusatz eines Umesterungskatalysators). Innerhalb der Blendstruktur lagen die aromatischen und aliphatischen Polyesterketten in aromatischen bzw. aliphatischen Segregaten vor. Zur groben Abschätzung deren Größe wurden die aliphatischen Segregate (SP 4/6) mit Chloroform herausgelöst, und die chloroformunlöslichen Partikel (=aromatische Segregate, PBT) lichtmikroskopisch ausgemessen. Die Größe der aliphatischen Segregate konnte mit dieser einfachen Methode nicht direkt ermittelt werden. Unter der groben Annahme, daß in dem Blend die aromatischen und aliphatischen Segregate in gleicher Größenordnung vorlagen,

kann folgende Größenverteilung angegeben werden  $\varnothing_{\text{Segregat}}$  ca. 10 bis 100  $\mu\text{m}$ .

Durch Umesterungsreaktionen von PBT und SP4/6 in der Schmelze wurden Block-Copolyester  $\text{BTA}_{\text{Block}}50:50$  hergestellt, deren aliphatische und aromatische Blocklängen in Abhängigkeit von der Umesterungszeit variierten. Die Ergebnisse der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Untersuchungen sind in Tab. 4-12 und in Abb. 4-51 im Vergleich zu den statistischen und alternierenden BTA-Copolyestern mit dem gleichen Terephthalsäureanteil von 50 % dargestellt.

Tab. 4-12:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Meßdaten der aliphatisch-aromatischen Copolyester mit 50 mol-% Terephthalsäure: Die Abkürzungen im Tabellenkopf wurden in Tab. 4-11 beschrieben.

Copolyester	Polyester-Zusammensetzung $M_T: M_A$ [mol-%]	Mittlere Sequenzlänge		Unordnungsgrad $U_R$
		$\overline{SL}_T$	$\overline{SL}_A$	
PBT-SP4/6-Blend	50:50	-	-	-
Block (20 min) $\text{BTA}_{\text{Block}}50:50$	53: 47	10	9	0,2
Block (30 min) “	49: 51	9	10	0,2
Block (60 min) “	51: 49	7	7	0,3
statistisch $\text{BTA } 50:50$	51: 49	2	2	1,0
alternierend $\text{BTA}_{\text{altern.}}50:50$	50: 50	1	1	2,0

In den Block-Copolyestern  $\text{BTA}_{\text{Block}}50:50$  (Abb. 4-51 d, e) verkürzten sich mit zunehmender Umesterungsdauer die mittleren aromatischen und aliphatischen Sequenzlängen. Der statistische Copolyester BTA 50:50 zeigte die theoretisch berechneten mittleren Sequenzlängen von  $\overline{SL}_T = \overline{SL}_A = 2$  (vgl. Tab. 4-9 auf Seite 78). Bei dem alternierenden Copolyester  $\text{BTA}_{\text{altern.}}50:50$  lag die gewünschten minimale aromatische und aliphatische Sequenzlänge von  $\overline{SL}_T = \overline{SL}_A = 1$  vor.

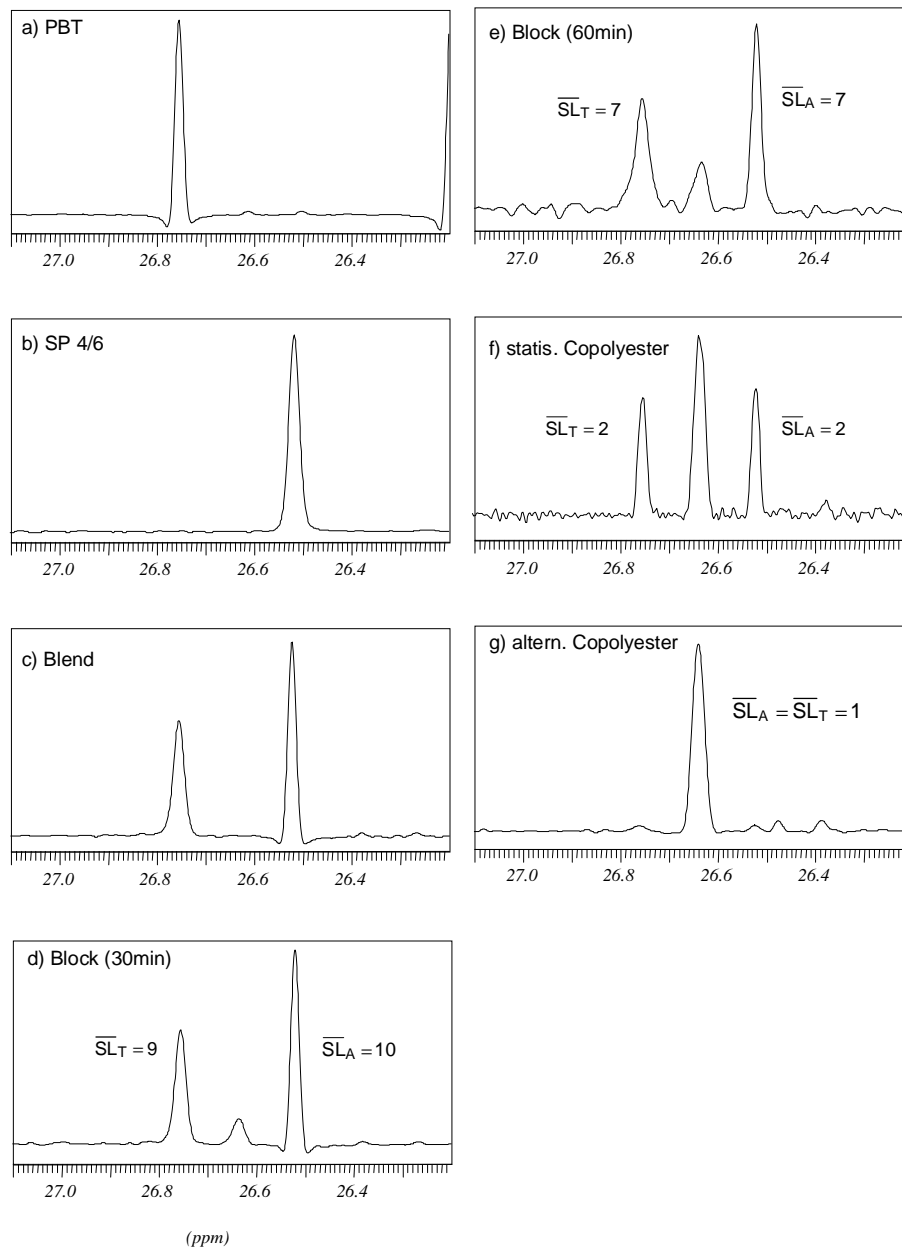


Abb. 4-51:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von BTA-Copolyestern mit 50 mol-% Terephthalsäure: Die Spektren der Homopolyester SP 4/6 und PBT dienen dem Vergleich.  $\overline{\text{SL}}_{\text{T}}$  und  $\overline{\text{SL}}_{\text{A}}$  geben die aus den Peakintegralen, gemäß Gleichungen (4-11) und (4-12), berechneten zahlenmittleren aromatischen und aliphatischen Sequenzlängen an. (Lösungsmittel: deuterierte Tri-fluoressigsäure, Spreizung: im Bereich der zwei mittleren Kohlenstoffatome des Tetramethylenglycols).

Durch Austausch der Adipinsäure (A) gegen andere aliphatische Disäuren (X) konnte der Einfluß der aliphatischen Säurekomponente auf den biologischen Abbau der BTX-Copolyester untersucht werden. Die Ergebnisse der Strukturuntersuchungen mittels  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie zeigt Tab. 4-13.

Tab. 4-13:  $^{13}\text{C}$ -NMR-Meßdaten von a) alternierenden Copolyestern  $\text{BTX}_{\text{altern. 50:50}}$ , b) alternierenden Copolyestern  $\text{BTX}_{\text{altern. 66:33}}$  und von c) statistischen Copolyestern  $\text{BTX}_{40:60}$  mit unterschiedlichen Disäuren X (Su: Succinic acid, A: Adipinsäure, K: Korksäure, Seb: Sebacinsäure, Dod: Dodecandisäure): Die Abkürzungen im Tabellenkopf wurden in Tab. 4-11 beschrieben.

Copolyester	$M_T$ [mol-%]	$M_X$ [mol-%]	$\overline{SL}_T$	$\overline{SL}_X$	$U_R$
<b><math>\text{BTX}_{\text{altern. 50:50}}</math> (alternierend)</b>					
$\text{BTSu}_{\text{altern. 50:50}}$	50	50	1,1	1,1	1,9
$\text{BTA}_{\text{altern. 50:50}}$	50	50	1,0	1,0	2,0
$\text{BTK}_{\text{altern. 50:50}}$	50	50	1,0	1,0	1,9
$\text{BTSeb}_{\text{altern. 50:50}}$	50	50	1,0	1,0	1,9
$\text{BTDod}_{\text{altern. 50:50}}$	50	50	1,0	1,0	2,0
<b><math>\text{BTX}_{\text{altern. 66:33}}</math> (alternierend)</b>					
$\text{BTA}_{\text{altern. 66:33}}$	66	34	2,1	1,1	1,4
$\text{BTSeb}_{\text{altern. 66:33}}$	67	33	2,3	1,1	1,3
$\text{BTDod}_{\text{altern. 66:33}}$	66	34	2,0	1,0	1,5
<b><math>\text{BTX}_{40:60}</math> (statistisch)</b>					
$\text{BTSu}_{40:60}$	40	60	1,7	2,5	1,0
$\text{BTA}_{40:60}$	40	60	1,7	2,5	1,0
$\text{BTK}_{40:60}$	41	59	1,7	2,4	1,0
$\text{BTSeb}_{40:60}$	39	61	1,6	2,5	1,0
$\text{BTDod}_{40:60}$	38	62	1,6	2,6	1,0

Die Ergebnisse der kernresonanzspektroskopischen Untersuchungen bestätigen die gewünschten Mikrostrukturen. In den alternierenden Copolyestern lagen erwartungsgemäß die kleinsten Sequenzlängen vor ( $\text{BTX}_{\text{altern. 50:50}}$ :  $\overline{SL}_X = \overline{SL}_T = 1$  bzw.  $\text{BTX}_{\text{altern. 66:33}}$ :  $\overline{SL}_X = 1$   $\overline{SL}_T = 2$ ), wobei die Sequenzlängenverteilung sehr gering war.

### 4.5.1.2 Thermische Charakterisierung

Die thermische Charakterisierung der Copolyester erfolgte mittels Differentialthermoanalyse (Differential Scanning Calorimetry, DSC). Für die statistischen aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester beschrieb WITT (1996) mit steigendem Terephthalsäureanteil zunehmende Schmelztemperaturen und sinkende biologische Abbauraten. Im Gegensatz zu den statistischen BTA-Copolyestern, wiesen die in dieser Arbeit hergestellten BTA-Copolyester ( $\text{BTA}_{\text{altern.}} 50:50$ ,  $\text{BTA}_{\text{Block}} 50:50$ ) und der PBT-SP4/6-Blend einen konstanten Terephthalsäureanteil auf. Somit boten diese Polyester die Möglichkeit, die Schmelztemperaturen der Copolyester für einen konstanten Terephthalsäureanteil in Abhängigkeit von der jeweiligen Mikrostruktur zu untersuchen (Tab. 4-14).

Tab. 4-14: GPC- und DSC-Meßdaten von aliphatisch-aromatischen Copolyestern mit einem konstanten Terephthalsäureanteil (50 mol-% des Gesamtsäureanteils). Zum Vergleich sind die Daten der Homopolyester SP 4/6 und PBT angegeben. Die gemessenen DSC Kurven zeigt Abb. 8-12 (Seite 168).

Copolyester	$M_w$ [g mol <sup>-1</sup> ]	$T_m^{\text{a)}}$ [°C]
SP 4/6	46200	57
PBT	n.m. <sup>b)</sup>	227
PBT-SP4/6-Blend	n.m. <sup>b)</sup>	56/ 224
$\text{BTA}_{\text{Block}} 50:50$ , 20 min <sup>c)</sup>	n.m. <sup>b)</sup>	53/ 216
$\text{BTA}_{\text{Block}} 50:50$ , 30 min <sup>c)</sup>	n.m. <sup>b)</sup>	45/ 214
$\text{BTA}_{\text{Block}} 50:50$ , 60 min <sup>c)</sup>	n.m. <sup>b)</sup>	48/ 200
BTA 50:50	51000	134
$\text{BTA}_{\text{altern.}} 50:50$	18400	85

a) Maximum der Kristallitschmelzpunkte (2. Heizlauf, HR: 10 °C·min<sup>-1</sup>). Der Blend und die Block-Copolyester ergaben zwei endotherme Signale.

b) Die Block-Copolyester und der Blend waren in Chloroform nicht vollständig löslich, so daß auf der zur Verfügung stehenden GPC-Anlage (Chloroform als Elutionsmittel) keine Molmassenbestimmung möglich war.

c) Dauer der Umesterungsreaktion.

Der PBT-SP4/6-Blend und die Block-Copolyester weisen zwei endotherme Schmelzpeaks auf, die im Temperaturbereich der Schmelzpunkte der entsprechenden Homopolyester lagen. Das Vorliegen der zwei Schmelzpeaks zeigt, daß weder der PBT-SP4/6-Blend noch die Block-Copolyester molekularhomogen mischbar sind. Auch ein Blend aus PBT und SP 4/4 wurde von KIM und PARK (1999) als nicht homogen mischbar, d.h. unverträglich,

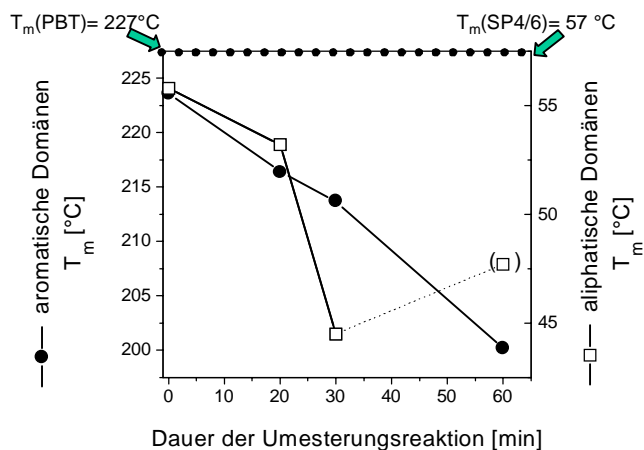
beschrieben. Die unverträglichen aliphatischen und aromatischen Kettensegmente kristallisieren in verschiedenartigen nebeneinander vorliegenden Kristalliten, die sich zu hauptsächlich aliphatischen bzw. aromatischen Domänen zusammenlagern [VOLLMERT 1988].

Bei den untersuchten Block-Copolyestern  $\text{BTA}_{\text{Block}}50:50$  sanken die Kristallitschmelztemperaturen der aromatischen und aliphatischen Domänen mit zunehmender Umesterungsdauer (Abb. 4-52).

Abb. 4-52:

Abnahme der Kristallitschmelzpunkte von aliphatischen und aromatischen Domänen der Block-Copolyester  $\text{BTA}_{\text{Block}}50:50$  mit steigender Umesterungsdauer.

Die z.T. schwach ausgeprägten Schmelzpeaks erschwerten die Bestimmung der Kristallitschmelztemperaturen (s. eingeklammelter Wert und vgl. DSC-Kurven in Abb. 8-12, Seite 168).

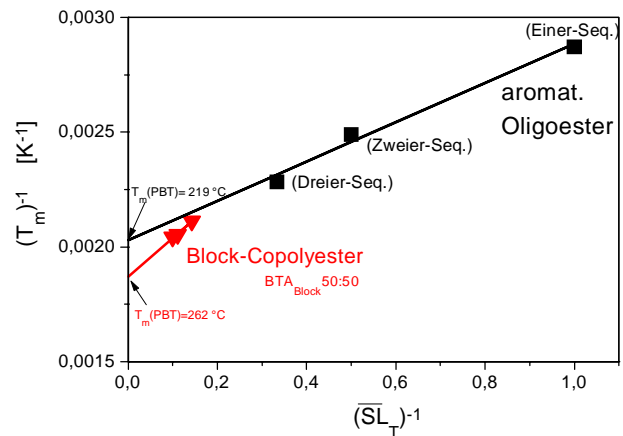


Das makroskopische thermische Verhalten der Copolyester, d.h. die Wärmeformbeständigkeit, wird somit hauptsächlich durch das Schmelzverhalten der aromatischen Domänen bestimmt. Erst nach dem Aufschmelzen der aromatischen Kristallite schmelzen die Block-Copolyester.

Im folgenden wird untersucht, ob die mit zunehmender Umesterungsdauer sinkenden aliphatischen bzw. aromatischen Kristallitschmelztemperaturen eine Funktion der mittleren Sequenzlängen darstellen. Eine Abhängigkeit der Schmelztemperaturen von der Sequenzlänge wird auch für Paraffine von FLORY und VRIJ (1963) beschrieben. Liegen die Schmelzpunkte von Oligomeren vor, ist unter Berücksichtigung der jeweiligen Sequenzlängen eine Berechnung der Schmelztemperatur des analogen Polymers mit unendlichen Sequenzlängen möglich. Nach dieser Methode war auch die Ermittlung der Polyester-schmelztemperatur von PBT möglich (Abb. 4-53).

Abb. 4-53:

Reziproke Schmelzpunkte ( $T_m^{-1}$ ) von Block-Copolyestern BTA<sub>Block</sub>50:50 und aromatischen Oligoestern (Einer, Zweier- und Dreier-Sequenz) in Abhängigkeit von der reziproken mittleren aromatischen Sequenzlänge ( $(\overline{SL}_T)^{-1}$ ). Auftragung nach FLORY und VRIJ (1963).



Die grafische Auftragung der reziproken Oligoester-Schmelztemperaturen als Funktion der reziproken Sequenzlängen ergibt eine Gerade, deren Extrapolation auf die Ordinate in guter Annäherung die Schmelztemperatur von Polybutylenterephthalat PBT ( $T_m = 227^\circ\text{C}$ ) zeigt.

Demgegenüber lag der aus den Schmelztemperaturen der Block-Copolyestern ermittelte Schmelzpunkt für PBT mit  $262^\circ\text{C}$  oberhalb des tatsächlichen Schmelzpunktes von  $T_m(\text{PBT}) = 227^\circ\text{C}$  (Abb. 4-53). Dieses ist sicherlich darin begründet, daß FLORY und VRIJ die im Vergleich zu dem Polymer tieferen Oligomer-Schmelztemperaturen mit dem Einfluß der Kettenenden begründet. Innerhalb der Copolyesterketten liegen jedoch für die betrachteten aromatischen Sequenzen keine Kettenenden vor, so daß eine analoge Beeinflussung des Schmelzpunktes letztendlich nicht zu erwarten war.

Im Mittelpunkt der thermischen Charakterisierung steht die Frage, wie die für die Copolyester typischen Strukturmerkmale (mittlere aliphatische bzw. aromatische Sequenzlänge) mit den makroskopischen Polymereigenschaften, wie hier der thermischen Eigenschaft, korreliert werden können. Für die aliphatisch-aromatischen Copolyester läßt sich die Abhängigkeit des makroskopischen Schmelzverhaltens von der mittleren aromatischen Sequenzlänge  $\overline{SL}_T$  durch die in Gleichung (4-14) angegebene, empirisch ermittelte logistische Ausgleichkurve angleichen (Abb. 4-54). Als Grenzwerte gehen in die Gleichung die Schmelzpunkte der analogen aromatischen ( $T_m(\text{PBT}) = 227^\circ\text{C}$ ) und aliphatischen Homopolyester (z.B.  $T_x(\text{SP 4/6}) = 57^\circ\text{C}$ ) ein (4-14).

$$T_m = \frac{T_x - 227^\circ\text{C}}{1 + \left(\frac{\overline{SL}_T}{2,3}\right)^{2,4}} + 227^\circ\text{C} \quad (4-14)$$

$T_x$  = Schmelztemperatur des analogen aliphatischen Homopolyesters, z.B.  $T_m(\text{SP 4/6}) = 57^\circ\text{C}$

Anhand dieser Gleichung läßt sich die Schmelztemperatur für BTA-Copolyester mit beliebiger Stöchiometrie und Mikrostruktur anhand der mittleren aromatischen Sequenzlänge berechnen.

Die wesentliche Konsequenz der obigen Betrachtungen ist, daß das u.a. auch technisch interessante makroskopische Schmelzverhalten der Copolyester ausschließlich von der mittleren Sequenzlänge der als Homopolyester höher schmelzenden Copolyesterkomponente abhängt. Die Wärmeformbeständigkeit ist somit keine allgemeine Funktion der Bruttozusammensetzung der Copolymere. So wurden beispielsweise für den alternierenden Copolyester BTA<sub>altern.</sub> 66:33, den statistischen Copolyester BTA 50:50 und die aromatische Zweier-Sequenz, die sich zwar in den Terephthalsäureanteilen und den mittleren aliphatischen Sequenzlängen unterschieden, jedoch eine einheitliche mittlere aromatische Sequenzlänge von  $\overline{SL}_T = 2$  aufwiesen, ein einheitlicher Schmelzpunkt von ca. 130 °C gemessen (Abb. 4-54).

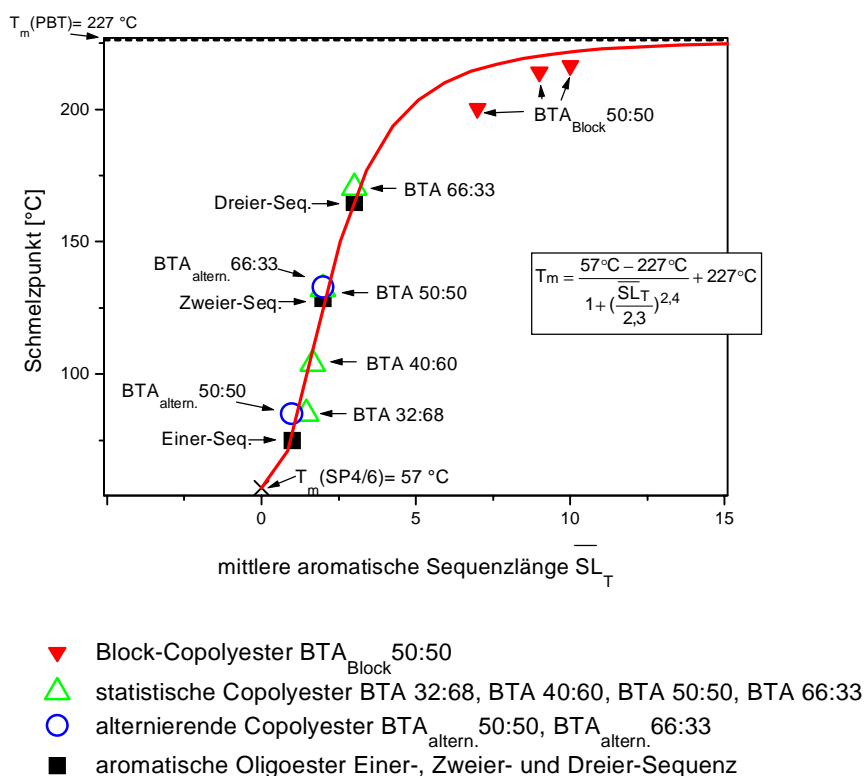


Abb. 4-54: Schmelztemperaturen von aliphatisch-aromatischer Copolyestern und aromatischen Oligoestern in Abhängigkeit von der mittleren aromatischen Sequenzlänge  $\overline{SL}_T$ .

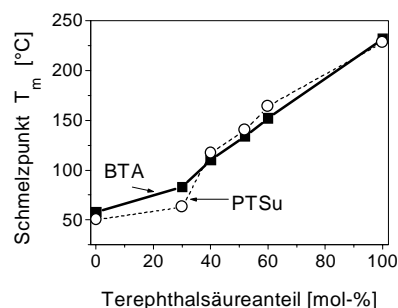
Copolyester, die anstelle von Adipinsäure andere aliphatische Disäuren enthalten, sollten unter Zugrundelegen der empirischen Gleichung (4-14) ähnliche Schmelzpunkte, wie die



BTA-Copolyester aufweisen. Tatsächlich fand KOLPACK (1998) unter gleichzeitigem Austausch der aliphatischen Disäure (Austausch von Adipinsäure gegen Bernsteinsäure) und des Diols (1,4-Butandiol gegen 1,3-Propandiol) bei PTSu-Copolyestern (1,3-Propandiol, Terephthalsäure, Succinic acid = Bernsteinsäure) Schmelzpunkte, die denen der BTA-Copolyester weitgehend entsprachen (Abb. 4-55).

Abb. 4-55:

Vergleich der Schmelzpunkte von zwei statistischen Copolyestern (BTA und PTSu), die sich in der aliphatischen Säuren unterscheiden, in Abhängigkeit vom Terephthalsäureanteil [KOLPACK 1998].



Auch für die übrigen, in dieser Arbeit untersuchten Polyesterstrukturen werden die gemessenen Schmelzpunkte mit den mittels der empirischen Formel (4-14) berechneten Werten verglichen (Tab. 4-15).

Tab. 4-15: DSC- und GPC-Meßdaten von a) alternierenden Copolyestern BTX<sub>altern.</sub>50:50 und b) alternierenden Copolyestern BTX<sub>altern.</sub>66:33 sowie c) statistischen Copolyestern BTX 40:60 mit unterschiedlichen aliphatischen Disäuren (Su: Succinic acid, A: Adipinsäure, K: Korksäure, Seb: Sebacinsäure, Dod: Dodecandisäure).

Copolyester	C-Atome der Disäure	$T_m^a$ (berechnet) [°C]	$T_m^b$ (gemessen) [°C]	$M_w^c$ [g mol <sup>-1</sup> ]
BTX <sub>altern.</sub> 50:50 (alternierend)				
BTSu <sub>altern.</sub> 50:50	4	127	113	24900
BTA <sub>altern.</sub> 50:50	6	77	85	18400
BTK <sub>altern.</sub> 50:50	8	80	75	19600
BTSeb <sub>altern.</sub> 50:50	10	86	83	18100
BTDod <sub>altern.</sub> 50:50	12	91	89	14900
BTX <sub>altern.</sub> 66:33 (alternierend)				
BTA <sub>altern.</sub> 66:33	6	133	135	21000
BTSeb <sub>altern.</sub> 66:33	10	134	121	6100 <sup>d)</sup>
BTDod <sub>altern.</sub> 66:33	12	137	127	15000
BTX 40:60 (statistisch)				
BTSu 40:60	4	151	107	31000
BTA 40:60	6	112	105	52100
BTK 40:60	8	114	107	32300

Copolyester	C-Atome der Disäure	$T_m^a)$ (berechnet) [°C]	$T_m^b)$ (gemessen) [°C]	$M_w^c)$ [g mol <sup>-1</sup> ]
BTSeb 40:60	10	114	98	27400
BTDod 40:60	12	118	102	32600

- a) Berechnete Schmelztemperaturen auf der Basis von Gleichung (4-14), Seite 89
- b) Maximum des Kristallit-Schmelzpeaks gemäß DSC-Messung. Die DSC-Meßkurven für die Copolyester der Strukturen BTX<sub>altern.</sub> 50:50 und BTX 40:60 sind im Anhang in Abb. 8-13 und Abb. 8-14 dargestellt.
- c) GPC-Messung bezogen auf Polystyrol-Standard.
- d) Bei der Synthese von BTSeb<sub>altern.</sub> 66:33 kam es zu einem Siedeverzug, in dessen Folge offenbar ungleiche Molverhältnisse der Edukte vorlagen und die Molmasse des Produktes gering blieb. Trotz der geringen Molmasse konnten Polymerfilme gepreßt werden.

Mit Ausnahme der Copolyester auf der Basis von Bernsteinsäure stimmen die berechneten Schmelztemperaturen relativ gut mit den gemessenen Werten überein. Die vergleichsweise starken Abweichungen der Copolyester BTSu<sub>altern.</sub> 50:50 und BTSu 40:60 (12 bzw. 41 %) beruhen auf einem systematischen Fehler der empirischen Beziehung, die zur Berechnung der Schmelztemperaturen zugrunde gelegt wurde. Mittels Gleichung (4-14) berechnet sich für die Copolyester grundsätzlich eine im Vergleich zu den analogen aliphatischen Homopolyestern höhere Schmelztemperatur. Die vergleichsweise hohe Schmelztemperatur des aliphatischen Homopolyesters SP 4/4 ( $T_m(\text{SP4/4}) = 115\text{ °C}$ ) erklärt sich aus der kurzen identischen Kohlenstoffkettenlänge von Diol und Disäure, die eine dichte Kettenpackung mit hohen zwischenmolekularen Wechselwirkungen ermöglichen [VOLLHARDT 1988]. Durch den Einbau der Terephthalsäure in die regelmäßige Struktur des SP 4/4 verringert sich die Packungsordnung, so daß Terephthalsäure in diesem Fall nicht zu einer Erhöhung der Schmelztemperatur führt ( $T_m(\text{BTSu}_{\text{altern.}} 50:50) = 113\text{ °C}$ ,  $T_m(\text{BTSu } 40:60) = 107\text{ °C}$ ). Die empirisch ermittelte Gleichung (4-14) ist daher nur zur Berechnung von Schmelztemperaturen solcher aliphatisch-aromatischen BTX-Copolyester geeignet, deren analoge aliphatische Homopolyester Schmelztemperaturen von maximal 75 °C aufweisen ( $T_m(\text{aromatische Einer-Sequenz}) = 75\text{ °C}$ ).

Anhand der oben diskutierten Untersuchungen kann das thermische Verhalten der aliphatisch-aromatischen Copolyester auf die mittlere aromatische Sequenzlänge  $\overline{SL_T}$  zurückgeführt werden.

Die Erhöhung des Schmelzpunktes und damit der Wärmeformbeständigkeit mit zunehmender aromatischer Sequenzlänge hat ihre Ursache in der Ausbildung größerer und besser geordneter Kristalle. Ein ähnlicher Zusammenhang wurde für segmentierte

Polyesterurethan-Elastomere mit einer konstanten stöchiometrischen Zusammensetzung und variierenden Hartsegmentlängen beschrieben [BÜTHE et al. 1989].

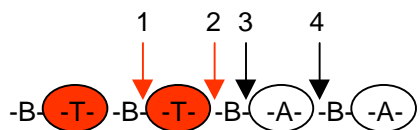
Vor dem Hintergrund, daß in der Literatur oftmals ein Zusammenhang von Schmelzpunkt und biologischer Abbaubarkeit für Polymere hergestellt wird ergibt sich die Frage, ob das biologische Abbauverhalten auch mit der aromatischen Sequenzlänge in den Polymerketten zusammenhängt. Dieser Frage wird im nächsten Kapitel nachgegangen.

## 4.5.2 Untersuchungen zum biologischen Abbau der Copolyester

In aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyestern können vier verschiedene Bindungstypen unterschieden werden (Abb. 4-56).

Abb. 4-56:

Vier Esterbindungstypen von aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyestern, die sich in der strukturellen Umgebung unterscheiden.



Der Bindungstyp Nr. 1 bzw. 4 kommt in den analogen aromatischen bzw. aliphatischen Homopolyestern vor. Die Resistenz des aromatischen Homopolyesters PBT (Bindungstyp 1) wurde mit der hohen Differenz zwischen Polyesterschmelztemperatur und Meßtemperatur und der geringen Kettenflexibilität erklärt (s. Kapitel 4.3). Die Spaltung von Esterbindungen des Typs 4 war in dem aliphatischen Homopolyester SP 4/4 prinzipiell möglich, wobei die Hydrolysegeschwindigkeit von der Differenz zwischen der Polyesterschmelz- und der Meßtemperatur abhing (s. Kapitel 4.4).

Über die enzymatische Spaltbarkeit der Bindungen 2 und 3 innerhalb von Polyesterketten liegen aus den bisherigen Untersuchungen keine Erkenntnisse vor. Der Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50 mit der alternierenden Mikrostruktur bietet nun die Möglichkeit zu untersuchen, ob wenigstens eine der Bindungstypen 2 bzw. 3 enzymatisch spaltbar ist.

Untersuchungen zum biologischen Abbau von BTA-Copolyestern liegen bislang nur für statistische und Block-Mikrostrukturen vor, wobei die Messungen in mikrobiellen Testsystemen (Erde und Kompost, WITT 1996, VAN DER ZEE 1997) durchgeführt wurden. In dem folgenden Kapitel werden die in mikrobiellen Umgebungen ermittelten Ergebnisse zum biologischen Abbau von statistischen BTA-Copolyestern mit den Ergebnissen enzymatischer Abbauuntersuchungen verglichen.

### 4.5.2.1 Variation der Terephthalsäurekonzentration

Für statistische aliphatisch-aromatische BTA-Copolyester wurde in früheren Arbeiten eine Verkleinerung der biologischen Abbauraten mit zunehmendem Terephthalsäuregehalt beschrieben [WITT 1996, VAN DER ZEE 1997]. Während diese Untersuchungen in praxisnahen Testsystemen (Abbauuntersuchungen in Erde bzw. Kompost) durchgeführt wurden, soll in dieser Arbeit zunächst geklärt werden, ob der bislang verwendete enzymatische Abbautest mittels Lipase von *P. spezie*s vergleichbare Ergebnisse liefert. Tatsächlich ergaben die enzymatischen Untersuchungen analoge Resultate (Abb. 4-57).

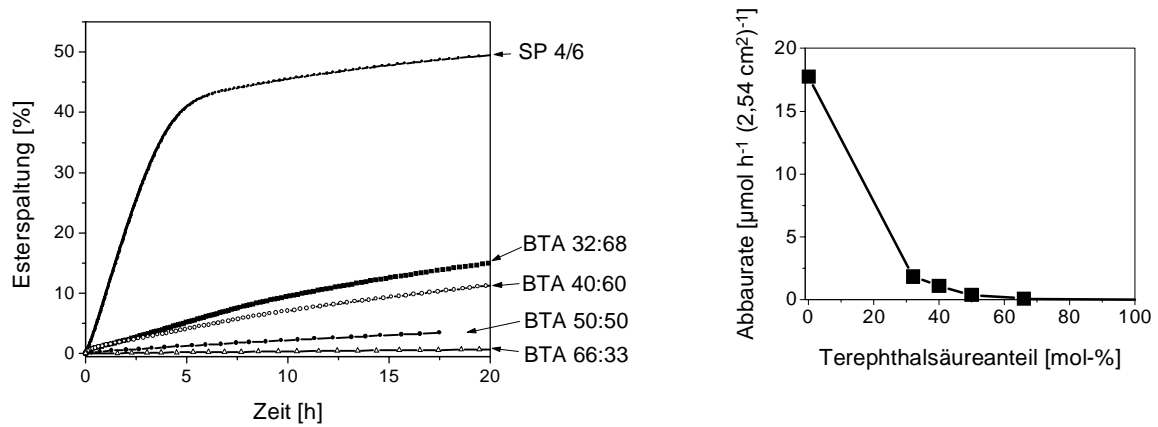


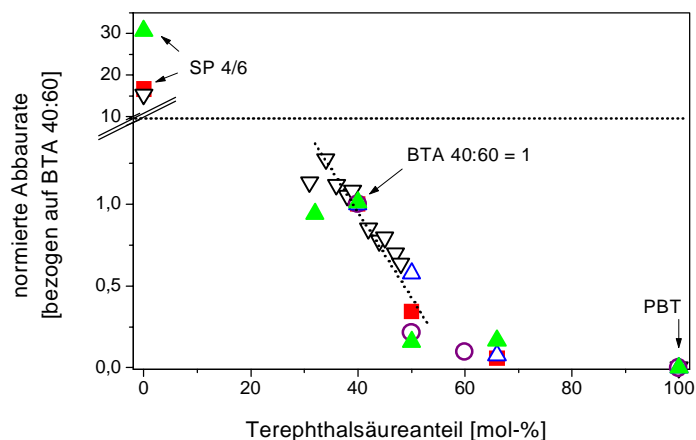
Abb. 4-57: Enzymatische Abbaukurven (links) und aus den Steigungen ermittelte Abbauraten (rechts) von statistischen BTA-Copolyestern mittels Lipase von *P. spezie*s bei 37 °C in Abhängigkeit von dem Terephthalsäureanteil.

Der aromatische Homopolyester Polybutylterephthalat PBT (Terephthalsäureanteil 100 %) wurde nicht enzymatisch angegriffen, der Film des aliphatischen Homopolyesters SP 4/6 war schon nach 5 Stunden vollständig in wasserlösliche Produkte überführt (Terephthalsäureanteil 0 %). Die statistischen Copolyester wurden im Vergleich zu SP 4/6 deutlich langsamer hydrolysiert, wobei die Abbaugeschwindigkeit mit zunehmendem Terephthalsäureanteil sank.

Um die enzymatischen Abbauergebnisse mit Ergebnissen anderer Testsysteme vergleichen zu können, wurden die ermittelten Abbauraten jeweils auf die für den statistischen Copolyester BTA 40:60 gemessene Abbaurate bezogen. Die so normierten Abbauraten sind in Abhängigkeit von dem Terephthalsäuregehalt der Copolyester in der Abb. 4-58 dargestellt. Zusätzlich zu den bei 37 °C durchgeführten enzymatischen Abbauuntersuchungen wurden mit der gleichen Lipase (*P. spezie*s) Versuche bei einer Meßtemperatur von 50 °C durchgeführt (enzymatische Abbaukurven bei 50 °C s. Abb. 8-15, Seite 171). Die Steigerung der Meßtemperatur von 37 °C auf 50 °C führte bei den Copolyestern nur zu einer geringen Zunahme der absoluten Abbauraten. Dies ist in den relativ großen Differenzen zwischen den Polyesterschmelz- und Meßtemperaturen begründet. Wie in Kapitel 4.4.1.2.1 ab Seite 53 gezeigt wurde, nimmt der Temperatureinfluß der Meßtemperatur erst bei ca. 30°C unterhalb des Polymerschmelzpunktes sehr stark zu.

Neben den enzymatischen Abbauuntersuchungen wurden vergleichende mikrobielle Abbauuntersuchungen mit der von KLEEBERG et al. (1998) beschriebenen thermophilen Mikroorganismen-Reinkultur (Aktinomyceten der Spezies *Thermomonospora fusca*) durchgeführt (Abb. 4-58).

Abb. 4-58:  
Verringerung der  
normierten Abbauraten  
von statistischen BTA-  
Copolyestern mit  
zunehmendem Tereph-  
thalsäureanteil in  
unterschiedlichen Test-  
systemen.



- Lipase (37°C, 24 h) [mmol h<sup>-1</sup>]
- ▲ Lipase (50°C, 24 h) [mmol h<sup>-1</sup>]
- △ Mikroorganismen-Reinkultur (50 °C, 18 d) [mg cm<sup>-2</sup> Woche<sup>-1</sup>]
- ▽ Mikroorganismen-Mischkultur (55 °C, 11 w) [mg cm<sup>-2</sup> Woche<sup>-1</sup>]
- Kompost (50 °C, 8 w) [mg cm<sup>-2</sup> Woche<sup>-1</sup>]

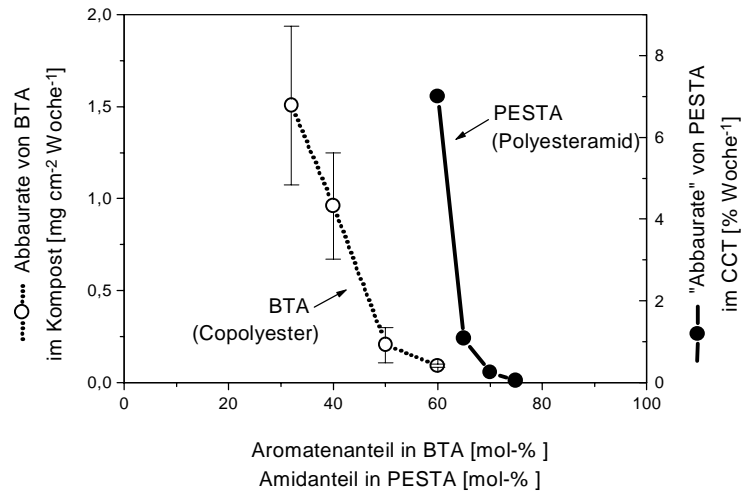
In allen untersuchten Testsystemen kann trotz unterschiedlicher Meßgrößen (Esterspaltung bzw. Massenverlust) und Meßtemperaturen (37 °C, 50 bzw. 55 °C) die Abnahme der Abbaugeschwindigkeiten mit zunehmendem Terephthalsäureanteil durch eine einzige Kurve mit relativ guter Genauigkeit beschrieben werden. Aus der oben gezeigten generellen Abhängigkeit ergibt sich die Möglichkeit das Abbauverhalten von Copolyestern unterschiedlicher Zusammensetzungen abzuschätzen, wenn man die absolute Abbaugeschwindigkeit einer Copolyesterzusammensetzung kennt.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch für eine andere Gruppe von Copolymeren, für die statistischen Polyesteramide (PESTA der BAYER AG) aus Aminocaprinsäure, Adipinsäure und 1,4-Butandiol gemacht [MÜLLER, P. et al. 1999] (Abb. 4-59).

Die Abbaugeschwindigkeit sinken mit zunehmendem Amidanteil., gibt MÜLLER gibt für die Polyesteramide anstelle von zeitbezogenen Abbauraten prozentuale Abbaugrade an, die in Kompostsimulationstests (Controlled Composting Test gemäß DIN V 54900) nach einer 65-tägigen Versuchsdauer ermittelt wurden. Diese Abbaugrade der Polyesteramide wurden durch die Versuchsdauer dividiert und so die in Abb. 4-59 angegebenen „Abbauraten“ berechnet. Bei den Berechnungen blieb der tatsächliche Verlauf der Abbaukurven aufgrund mangelnder Literaturdaten unberücksichtigt (so konnten auch eventuell vorhandene Lag-Phasen nicht berücksichtigt werden). Folglich können die für die Polyesteramide (PESTA) in Abb. 4-59 angegebenen „Abbauraten“ nur als Orientierungshilfe im Vergleich zu den in dieser Arbeit für die Copolyester (BTA) ermittelten Abbauraten dienen.

Abb. 4-59:

Abbaugrade von Polyesteramiden (PESTA der Firma BAYER AG) im Controlled Composting Test (CCT) [MÜLLER, P. et al. 1999] und von BTA-Copolyestern in der Abbauntersuchung in Kompost (Durchführung s. Kapitel **6.8.2.2**, Seite 148) mit zunehmendem Amid- bzw. Aromatenanteil.



Da die Abbauraten der aliphatisch-aromatischen Copolyester und der Polyesteramide nicht unter gleichen Testbedingungen ermittelt wurden, ist nur ein eingeschränkter Vergleich der Testergebnisse möglich. Sowohl bei den aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyestern, als auch bei den Polyesteramiden PESTA fiel jedoch die Abbaubarkeit in der mikrobiellen Umgebung des Komposts mit steigendem Aromaten- bzw. Amid-Anteil. Die Abbauraten sanken nicht linear mit sinkendem Aliphatenanteil über einen Bereich von 0 bis 100 mol-%, sondern oberhalb eines Amidanteils von etwa 65 mol-% bzw. eines Aromatenanteils von ca. 50 mol-% wurden nur noch sehr geringe Abbauraten gemessen.

Es stellt sich die Frage nach der Ursache für die sehr geringen Abbauraten der Copolymere mit erhöhtem Aromaten- bzw. Amidanteil. Vorausgesetzt in den Copolyesterketten sind nur die Esterbindungen des Typs Nr. 4 (vgl. Abb. 4-56, Seite 94) enzymatisch spaltbar, wäre mit zunehmendem Terephthalsäureanteil keine so starke Verringerung der Abbauraten zu erwarten gewesen, wie sie tatsächlich gemessen wurde (Abb. 4-60). Folglich war die Verringerung der Abbauraten der Copolymere nicht ausschließlich eine Funktion des Anteils des Bindungstyps 4. Das quantitative Vorkommen der einzelnen Bindungsklassen kann also das makroskopische Abbauverhalten nicht ausschließlich erklären.

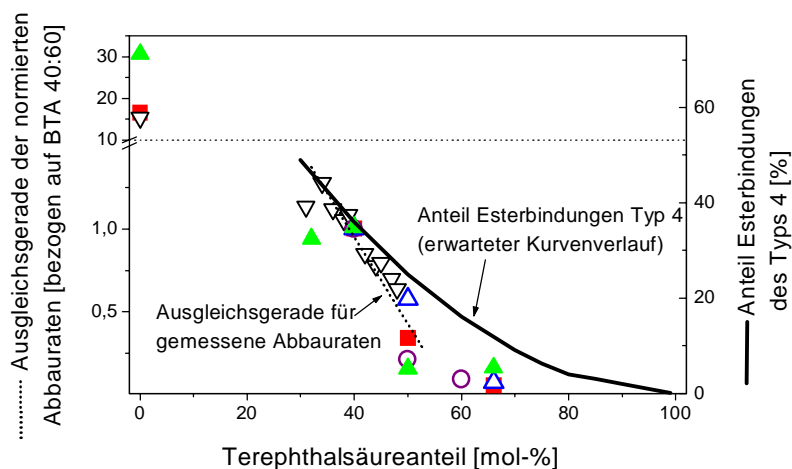


Abb. 4-60: Abnahme der gemessenen Abbauraten (Meßpunktzuordnung vgl. Abb. 4-58, Seite 96) als Funktion des Terephthalsäureanteils im statistischen BTA-Copolyester im Vergleich zu dem Kurvenverlauf unter der Voraussetzung, daß die Hydrolyse der Esterbindungen des Typs 4 (Bindungstyp s. Abb. 4-56, Seite 94) die Abbauraten kontrolliert.

Für die linearen aliphatischen Homopolyester wurde ein signifikanter enzymatischer Abbau mittels Lipase von *P. spezieis* nur dann festgestellt, wenn die Differenz zwischen der Polyesterschmelztemperatur und der Meßtemperatur geringer als ca. 30 °C war (vgl. Abb. 5-1, Seite 114). Diese Korrelation wurde um die enzymatischen Abbauraten der aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyester erweitert (je Copolyester lagen 2 Meßpunkte vor: Messung bei 37 bzw. 50 °C) (Abb. 4-61). Auch die enzymatischen Abbauraten der BTA-Copolyester stiegen unter Verringerung der Differenz zwischen Schmelz- und Meßtemperatur. Im Gegensatz zu den aliphatischen Homopolyester (z.B. SP 4/4, SP 4/12), für die bei Differenzen zwischen Polymerschmelz- und Meßtemperatur um 50 °C kein enzymatischer Abbau mehr detektiert wurde, ergaben die BTA-Copolyester sogar bei noch höheren Temperaturdifferenzen einen meßbaren enzymatischen Abbau (s. Teilvergrößerung in Abb. 4-61).



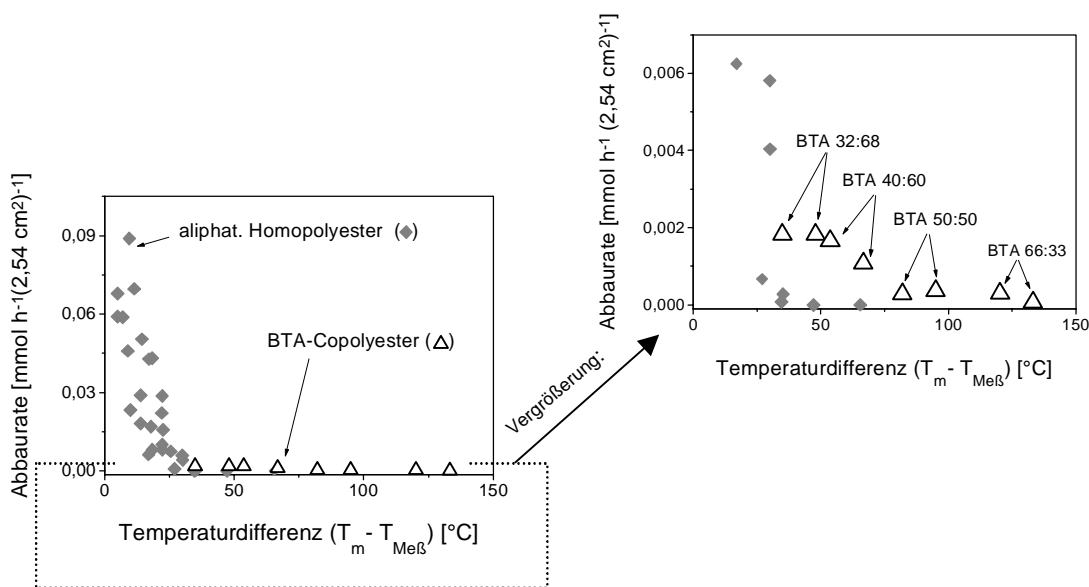


Abb. 4-61: Verringerung der enzymatischen Abbauraten von aliphatischen Homopolyestern und statistischen BTA-Copolyestern bei Vergrößerung der Temperaturdifferenz zwischen der Polymerschmelztemperatur ( $T_m$ ) und der Meßtemperatur ( $T_{\text{Meß}}$ ) (Lipase von *P. spezie*s).

Um den Einfluß der aromatischen Sequenzlängen auf den biologischen Abbau von BTA-Copolyestern unabhängig von einer Änderung der Terephthalsäuremenge zu untersuchen, wurden Abbauntersuchungen an BTA-Copolyestern mit unterschiedlichen Mikrostrukturen bei konstanten Terephthalsäureanteilen durchgeführt.

#### 4.5.2.2 Variation der mittleren aromatischen Sequenzlänge

Um den Einfluß der mittleren aromatischen Sequenzlänge und damit der Polyesterschmelztemperatur ( $T_m = f(\overline{SL_T})$ , s. Abb. 4-54, Seite 90) auf den biologischen Abbau von BTA-Copolyestern näher zu untersuchen, wurden Copolyester mit einem konstanten Terephthalsäureanteil von 50 mol-% und unterschiedlichen Mikrostrukturen (s. Abb. 4-46, Seite 74) synthetisiert. Dabei stellt der alternierende Copolyester eine bislang nicht beschriebene Struktur dar, die im Gegensatz zu statistischen Copolyestern Struktur-Abbaubarkeits-Beziehungen für eine bestimmte aromatische und aliphatische Sequenzlänge ermöglicht.

Die verschiedenen Copolyesterstrukturen wurden im Vergleich zu dem PBT-SP4/6-Blend und dem aliphatischen und aromatischen Homopolyester (SP 4/6 und PBT) auf ihren enzymatischen Abbau mittels Lipase von *P. spezie*s untersucht (37 bzw. 50  $^{\circ}\text{C}$ ) (Abb. 4-62).

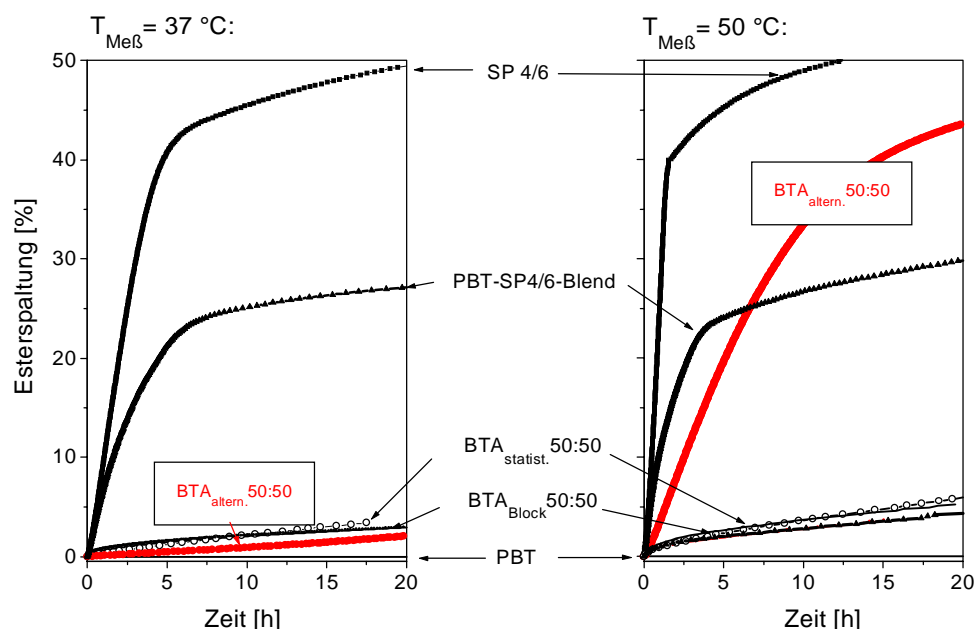


Abb. 4-62: Enzymatische Abbaukurven von verschiedenen Mischpolymeren mit einem einheitlichen Terephthalsäuregehalt von 50 mol-% (PBT-SP4/6-Blend, BTA-Copolyester mit unterschiedlichen Mikrostrukturen) mittels Lipase von *P. spezie*s bei 37 °C (links) bzw. 50 °C (rechts).

Der PBT-SP4/6-Blend wurde mit einer im Vergleich zu dem reinen aliphatischen Homopolyester SP 4/6 geringeren Abbaurate hydrolysiert, wobei am Ende des Versuches ein feines Pulver zurückblieb. Der inerte Rückstand machte etwa 50 % der Anfangsmasse aus und war, wie PBT, in Chloroform unlöslich. Somit liegt die Vermutung nahe, daß nur der aliphatische Blendanteil enzymatisch hydrolysiert wurde. Das Ergebnis der prozentualen Esterspaltung bestätigt diese Vermutung. Die Esterbindungen des aliphatischen Homopolyesters SP 4/6 wurde mittels LPs zu etwa 50 % gespalten (s. Abb. 4-35, Seite 59). Folglich war für die enzymatische Hydrolyse des PBT-SP4/6-Blends eine 25 %-ige Spaltung der vorhandenen Esterbindungen zu erwarten, was auch tatsächlich bei beiden Meßtemperaturen gemessen wurde (Abb. 4-62).

Der enzymatische Abbau der aliphatischen Segregate des PBT-SP4/6-Blends zeigt, daß die Lipase nicht nur aliphatische Esterbindungen an der Polymeroberfläche, sondern auch im Innern des Polymerfilmes angreifen konnte. Die Diffusion der Lipase in das Innere des Polyesterfilms setzt jedoch hinreichend große Hohlräume voraus. Im Vergleich zu dem Enzymdurchmesser ( $\varnothing_{\text{Enzym}} = 4,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{m}$ , Berechnung s. Gleichung (4-3) auf Seite 72) war der lichtmikroskopisch ermittelte Durchmesser der Segregate ( $\varnothing_{\text{Segregat}} = 10 \text{ bis } 100 \mu\text{m}$ ) um den Faktor 2000 bis 22000 größer. Durch den zunächst oberflächlichen enzymatischen

Abbau von aliphatischen Segregaten des PBT-SP4/6-Blends entstanden somit Hohlräume ausreichender Größe, in die das Enzym diffundieren konnte.

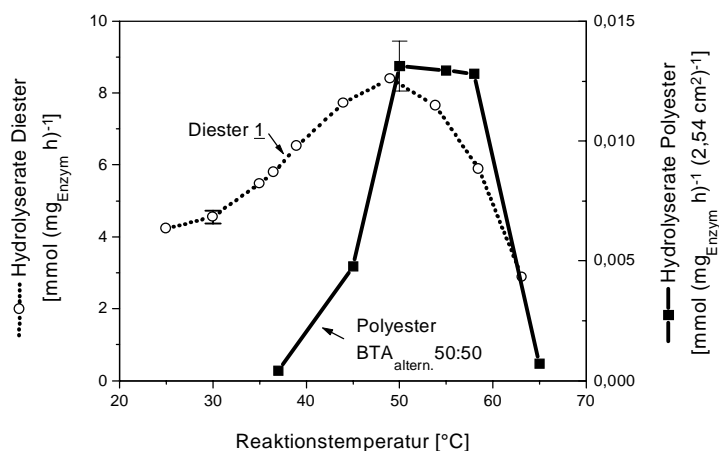
Im Gegensatz zu dem PBT-SP4/6-Blend, wurden die Block-Copolyester  $\text{BTA}_{\text{Block}50:50}$ , dessen aliphatischen und aromatischen Sequenzen kovalent verknüpft waren, nur sehr langsam enzymatisch hydrolysiert. Aufgrund der höheren Abbaurate des aliphatischen Modellesters Adipinsäuredibutylesters 1 im Vergleich zu dem Terephthalsäuredibutylester (vgl. Abb. 4-1, Seite 18) ist zu erwarten, daß der primäre enzymatische Angriff der Copolyesterketten an den Adipatbindungen erfolgt. Von solchen enzymatischen Schnittstellen innerhalb der aliphatischen Sequenzen, könnte der weitere Kettenabbau entlang der Polymerkette erfolgen. Da schon die aromatische Dreier-Sequenz ( $\overline{\text{SL}}_{\text{T}}=3$ ) nur sehr langsam enzymatisch hydrolysiert wurde (Abbaukurven s. Seite 33), sind auch für die längeren aromatischen Sequenzen innerhalb der Block-Copolyester ( $\overline{\text{SL}}_{\text{T}}=7$  bis 10) nur sehr geringe Abbauraten zu erwarten. Die wasserunlöslichen aromatischen Sequenzen könnten sich an der Polymeroberfläche anreichern und so den weiteren Abbau inhibieren. In die durch das Herauslösen der aliphatischen Sequenzen entstehenden Löcher kann das Enzym im Gegensatz zu den beim Abbau des PBT-SP4/6-Blends entstehenden Hohlräume offenbar nicht eindringen, was den geringen Abbau der Block-Copolyester erklärt.

Eine ähnlich langsame Abbaugeschwindigkeit wie für die Block-Copolyester, wurde bei beiden Meßtemperaturen auch für den statistischen Copolyester BTA 50:50 beobachtet (Abb. 4-62). Für den statistischen Copolyester BTA 50:50 und den Block-Copolyester  $\text{BTA}_{\text{Block}50:50}$  (die aufgrund ihrer aromatischen Sequenzlängen  $\overline{\text{SL}}_{\text{T}} > 2$  Schmelzpunkte oberhalb von 130 °C aufweisen, vgl. Abb. 4-54, Seite 90) wurden bei den zwei Meßtemperaturen (37 und 50 °C) vergleichbare enzymatische Abbaugeschwindigkeiten ermittelt (Abbaukurven s. Abb. 5-1, Seite 114).

Demgegenüber ließ sich für den alternierenden Copolyester  $\text{BTA}_{\text{altern.}50:50}$  durch Steigerung der Meßtemperatur im enzymatisch möglichen Rahmen eine deutliche Beschleunigung des Abbaus erzielen. Die Abbauraten des alternierenden Copolyesters  $\text{BTA}_{\text{altern.}50:50}$  stiegen mit der Meßtemperatur deutlich stärker (maximal um den Faktor 32), als die des niedermolekularen Modellesters Adipinsäuredibutylester 1 (maximal um den Faktor 1,4) (Abb. 4-63).

Abb. 4-63:

Abbauraten von Adipinsäuredibutylester 1 (keine Oberflächenangabe möglich) und des alternierenden Copolyesters BTA<sub>altern.</sub> 50:50 (Lipase von *P. spezie*s) in Abhängigkeit von der Meßtemperatur. Die Fehlerbalken ergaben sich aus Dreifachbestimmungen.



Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß nicht die Enzymaktivität hauptsächlich die Abbaugeschwindigkeit der Polyester bestimmt, sondern Polymer-spezifische Faktoren die wesentliche Rolle spielen. Wie die mit der Temperatur steigenden Abbauraten der aliphatischen Homopolyester (s. Kapitel 4.4.1.2.1ab Seite 53), kann auch die Zunahme der Abbauraten des alternierenden Copolyesters BTA<sub>altern.</sub> 50:50 bei Verringerung der Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelz- und Meßtemperatur, mit einer Verringerung der zwischen den Ketten wirksamen Anziehungskräfte erklärt werden. Mit der Annäherung der Meßtemperatur an die Kristallitschmelztemperatur werden die Kristallite enzymatisch spaltbar und damit der die Abbaugeschwindigkeit kontrollierende Schritt beschleunigt.

Interessanter Weise ist das Temperaturmaximum für den alternierenden Copolyester BTA<sub>altern.</sub> 50:50 zu höheren Meßtemperaturen verschoben, als das Temperaturmaximum des niedermolekularen Modelldiesters 1 (Abb. 4-63). Aufgrund der höheren Testzeit für die Abbauuntersuchungen der Copolyester (Versuchsdauer niedermolekulare ölförmige Modellester: 15 min; Polyester: 2 Stunden ) wäre jedoch gerade für die Copolyester eine stärkere durch thermische Enzymdenaturierung verursachte Verringerung der Abbauraten zu erwarten gewesen. Tatsächlich verliefen die Abbaukurven des Copolyesters BTA<sub>altern.</sub> 50:50 bei Meßtemperaturen von 50 bis 58 °C jedoch innerhalb der ersten zwei Teststunden nahezu deckungsgleich (s. Teilvergrößerung in Abb. 8-16, Seite 172). Erst bei einer höheren Meßtemperatur von 65 °C kam es schon nach wenigen Minuten zu einer starken Verringerung der Abbaugeschwindigkeit durch Enzymdenaturierung.

Die Steigerung der Meßtemperatur über 50 °C verringerte zwar durch thermische Enzymdenaturierung die Enzymaktivität, andererseits erhöhte sich unter Annäherung der Meßtemperatur an die Polyesterschmelztemperatur jedoch gleichzeitig die enzymatische Verfügbarkeit der Polyesterketten. Diese zwei gegenläufigen Temperatureinflüsse führten in

dem Temperaturbereich zwischen 50 und 58 °C zu vergleichbaren enzymatischen Abbauraten.

Der Effekt der Temperaturdifferenz zwischen Kristallitschmelztemperatur und Meßtemperatur läßt sich, ähnlich wie für die aliphatischen Homopolyester (Abb. 4-33, Seite 55), auch für die untersuchten aliphatisch-aromatischen Copolyester in einer gemeinsamen Abhängigkeit beschreiben (Abb. 4-64).

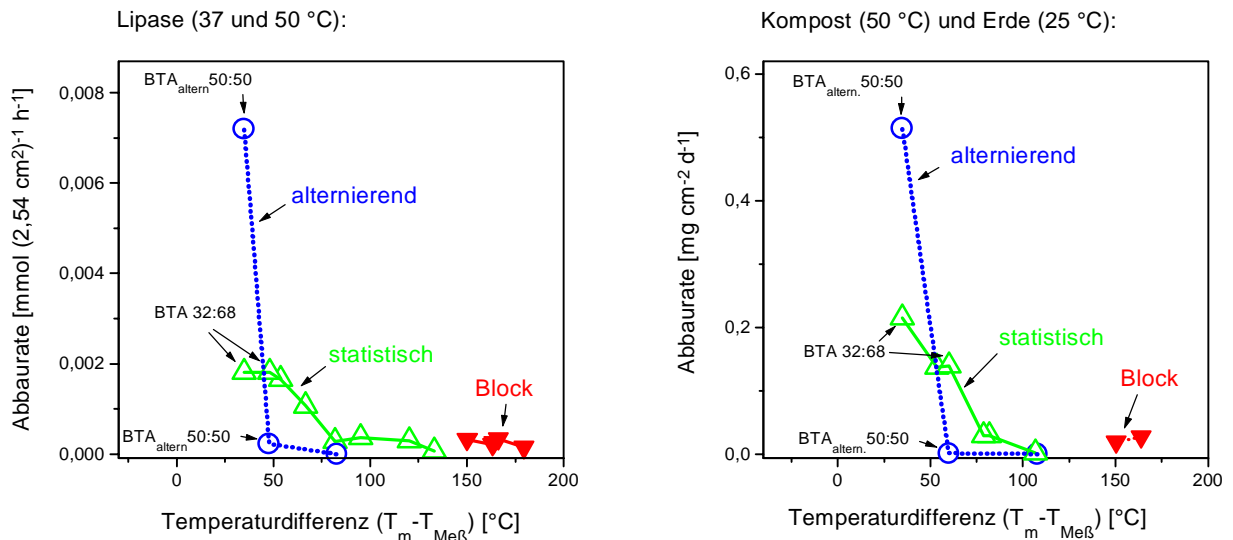


Abb. 4-64: Abnahme der Abbauraten von BTA-Copolyestern in Kompost und Erde (links) und mittels Lipase von *P. spezies* (rechts) bei Vergrößerung der Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelztemperatur ( $T_m$ ) und Meßtemperatur ( $T_{Meß}$ ). Die Copolyester unterscheiden sich in der Mikrostruktur (○ = alternierend, △ = statistisch, ▼ = Block-Copolyester).

Die Annäherung der Meßtemperatur an die jeweilige Polyesterschmelztemperatur beschleunigte den enzymatischen Abbau mittels Lipase von *P. spezies* und den Abbau in natürlicher Umgebung wie Erde und Kompost. In Abhängigkeit von der Temperaturdifferenz ergaben sich für die drei Gruppen der Copolyester Unterschiede in den Kurvensteigungen. Für die alternierenden Copolyester (BTA<sub>altern.</sub> 50:50 und BTA<sub>altern.</sub> 50:50) ist eine deutlich stärkere Zunahme der Abbauraten zu erkennen (blaue Kurve in Abb. 4-64), als für die Copolyester mit der statistischen Mikrostruktur (grüne Kurve in Abb. 4-64).

Bei Verringerung der Temperaturdifferenz von 60 auf 35 °C steigen die Abbauraten der alternierenden Copolyester ca. 5 mal stärker, als die Abbauraten der statistischen

Copolyester (Abb. 4-64). Weder enzymatisch bei 37 °C noch in Erdeingrabeuntersuchungen bei 25 °C wurde der alternierende Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50 abgebaut. Demgegenüber wurde der statistische Copolyester bei derselben Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelz- und Meßtemperatur (50 bzw. 60 °C) hydrolysiert. Dieser Unterschied soll im Zusammenhang mit dem Temperaturverhalten der Copolyester diskutiert werden. In Abb. 4-65 sind die mittels DSC ermittelten Schmelzkurven des alternierenden Copolyesters BTA<sub>altern.</sub>50:50 und des statistischen Copolyesters BTA 32:68 verglichen.

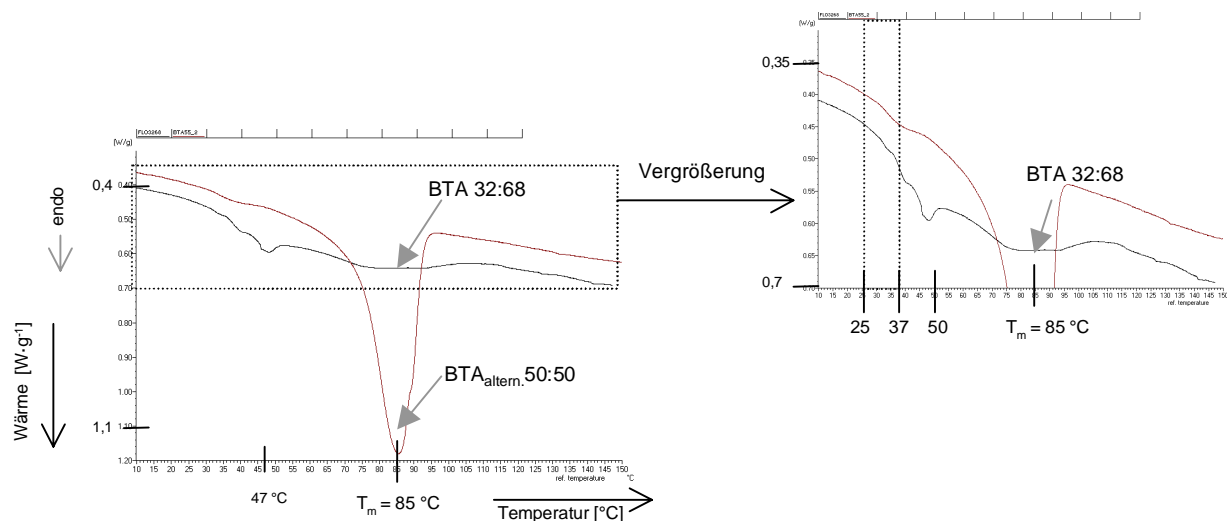


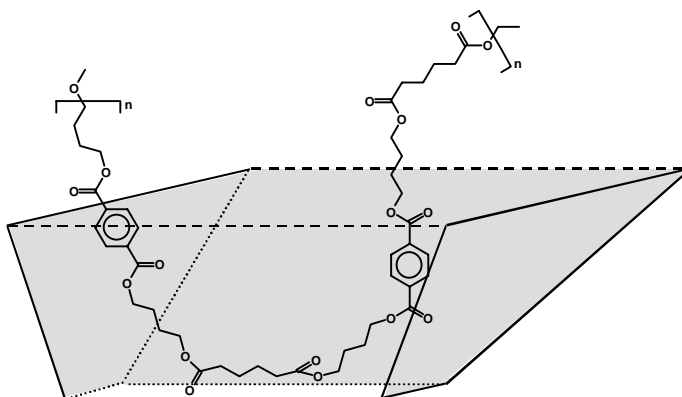
Abb. 4-65: Vergleich der DSC-Kurven des alternierenden Copolyesters BTA<sub>altern.</sub>50:50 und des statistischen Copolyesters BTA 32:68. Erster Heizlauf: 0 – 150 °C (10 K min<sup>-1</sup>). Einwaagen:  $m_{(\text{BTA } 50:50)} = 5,7 \text{ mg}$  und  $m_{(\text{BTA } 32:68)} = 5,6 \text{ mg}$ . Die Kurven sind für den Temperaturbereich (Abzisse) von 10 bis 150 °C und einem Wärmebereich (Ordinate) von 0,3 bis 1,2 W g<sup>-1</sup> (links) bzw. 0,3 bis 0,7 W g<sup>-1</sup> (rechts) dargestellt.

Der statistische Copolyester BTA 32:68 schmilzt über einen sehr viel breiteren Schmelzbereich, als der alternierende Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50. Einer Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelz- und Meßtemperatur von 50 °C bis 60 °C entspricht der Kurvenbereich der DSC-Kurve zwischen 25 und 37 °C. In Relation zu der Gesamtfläche des Schmelzpeaks ist für den statistischen Copolyester BTA 32:68 in diesem Temperaturbereich ein stärkeres Kristallitaufschmelzen zu beobachten, als für den alternierenden Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50.

Aus der Tatsache, daß für den alternierenden Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50 ein enzymatischer Abbau beobachtet wurde läßt sich ableiten, daß zumindest eine der zwei Esterbindungstypen Nr. 2 oder 3 (vgl. Abb. 4-56, Seite 94) von den verwendeten Enzymen

hydrolysiert wird. Aufgrund der für die niedermolekularen Modellester beobachteten höheren enzymatischen Hydrolysegeschwindigkeit der Adipatbindungen im Vergleich zu den Terephthalatbindungen (s. Abb. 4-1, Seite 18), kann auch für den alternierenden Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50 angenommen werden, daß die Adipatbindungen (Typ 3) mit höherer Geschwindigkeit enzymatisch gespalten werden. In Abb. 4-66 ist die Polyesterkette des alternierenden Copolyesters BTA<sub>altern.</sub>50:50 (Berechnung der Länge einer Repetiereinheit s. Abb. 8-8, Seite 165) schematisch so in den trogförmigen Zugangsbereich des aktiven Zentrums eingezeichnet, daß eine Adipatbindung des Typs 3 in der Nähe des katalytischen Zentrums liegt.

Abb. 4-66:  
Schematischer Einbau der  
Polyesterkette des alternierenden  
Copolyesters BTA<sub>altern.</sub>50:50 in den  
trogförmigen Bereich vor dem aktiven  
Zentrum der Lipase von  
*Pseudomonas cepacia*.



Die enzymatischen Abbauntersuchungen der aromatischen Homopolyester (s. Kapitel 4.3, Seite 44) haben gezeigt, daß Polyesterketten, die in der Nähe der zu spaltenden Esterbindung die Kettenbeweglichkeit (Faltbarkeit) verringernde Gruppen (aromatische oder aliphatische Ringe) besitzen, enzymatisch nur langsam hydrolysierbar sind. Im Vergleich zu den in Kapitel 4.3 diskutierten Polyesterstrukturen, sind in dem alternierenden Copolyester BTA<sub>altern.</sub>50:50 die die Kettenbeweglichkeit reduzierenden aromatischen Ringe in größerer Entfernung von der zu spaltenden Estergruppe entfernt. Dadurch ist einerseits der Raumbedarf der einzelnen Polyesterketten verringert und zum anderen die Beweglichkeit der Ketten erhöht. Beide Effekte sollten das Eindringen der Polyesterketten in den katalytischen Spalt und die für die Spaltung notwendige Positionierung am aktiven Zentrum der Lipase begünstigen.

Vorausgesetzt die enzymatische Abbaurate ist eine Funktion der Kettenbeweglichkeit, sollten die Abbauraten der alternierenden Copolyester durch Verlängerung der aliphatischen Säurekomponente, d.h. durch eine Verringerung der polaren Gruppen in den Polymerketten, die Abbaugeschwindigkeiten der Copolyester steigern. Die Gültigkeit dieses Postulates wird im nachfolgenden Kapitel anhand verschiedener aliphatisch-aromatischer Copolyester mit aliphatischen Säurekomponenten variierender Länge näher untersucht.

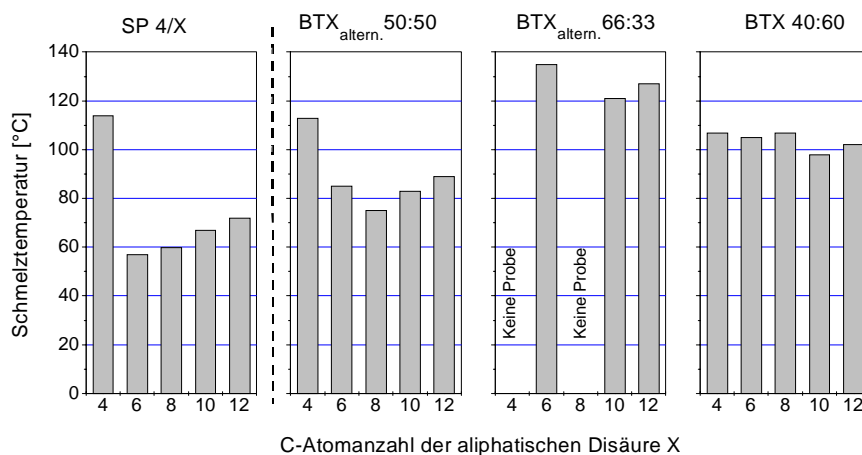
### 4.5.2.3 Variation der Länge der aliphatischen Säurekomponente

Durch eine Variation der Kohlenstoffkettenlänge der aliphatischen Säurekomponente in den aliphatisch-aromatischen Copolyestern soll der Frage nachgegangen werden, inwieweit die Länge des aliphatischen Spacers, die enzymatische Abbaugeschwindigkeit kontrolliert. Eine Verlängerung der Kohlenstoffkette der aliphatischen Disäure verringert zwar die Konzentration an spaltbaren Esterbindungen auf der Polymeroberfläche. Gleichzeitig erhöht sich aber auch die Kettenbeweglichkeit durch die Verringerung der Konzentration an polaren Gruppen. So sinken beispielsweise die Glas Temperaturen von aliphatische Homopolyester auf Basis von Ethylenglycol mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge [BATZER 1985]. Sofern die enzymatischen Abbauraten von Polyestern mit gleichen Schmelztemperaturen von der Kettenbeweglichkeit kontrolliert werden, sollten die Abbauraten mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge der aliphatischen Disäure (und sinkender Glas Temperatur) steigen.

Die Schmelztemperaturen der aliphatisch-aromatischen Copolyester mit unterschiedlichen Säurekomponenten X ( $\text{BTX}_{\text{altern.}} 50:50$ ,  $\text{BTX}_{\text{altern.}} 66:33$  und  $\text{BTX} 40:60$ ) werden hauptsächlich von der mittleren aromatischen Sequenzlänge bestimmt (Abb. 4-54, Seite 90). Daher differieren die Kristallitschmelztemperaturen der Copolyester bei Variation der Kohlenstoffkettenlängen der aliphatischen Disäure (4 bis 12 C-Atome) erwartungsgemäß weniger stark, als die Schmelztemperaturen der entsprechenden aliphatischen Homopolyestern (SP 4/X) (Abb. 4-67).

Abb. 4-67:

Schmelztemperaturen der aliphatischen Polyester SP 4/X und der aliphatisch-aromatischen Copolyester  $\text{BTX}_{\text{altern.}} 50:50$ ,  $\text{BTX}_{\text{altern.}} 66:33$  und  $\text{BTX} 40:60$  als Funktion der Anzahl der Kohlenstoffatome der aliphatischen Disäure X.



Die Schmelztemperaturen der statistischen Copolyester  $\text{BTX} 40:60$  differieren am wenigsten (Abb. 4-67).

Die Abbauraten der aliphatisch-aromatischen Copolyester stellen wieder in erster Linie eine Funktion der Kristallitschmelztemperaturen dar (Abb. 4-68).



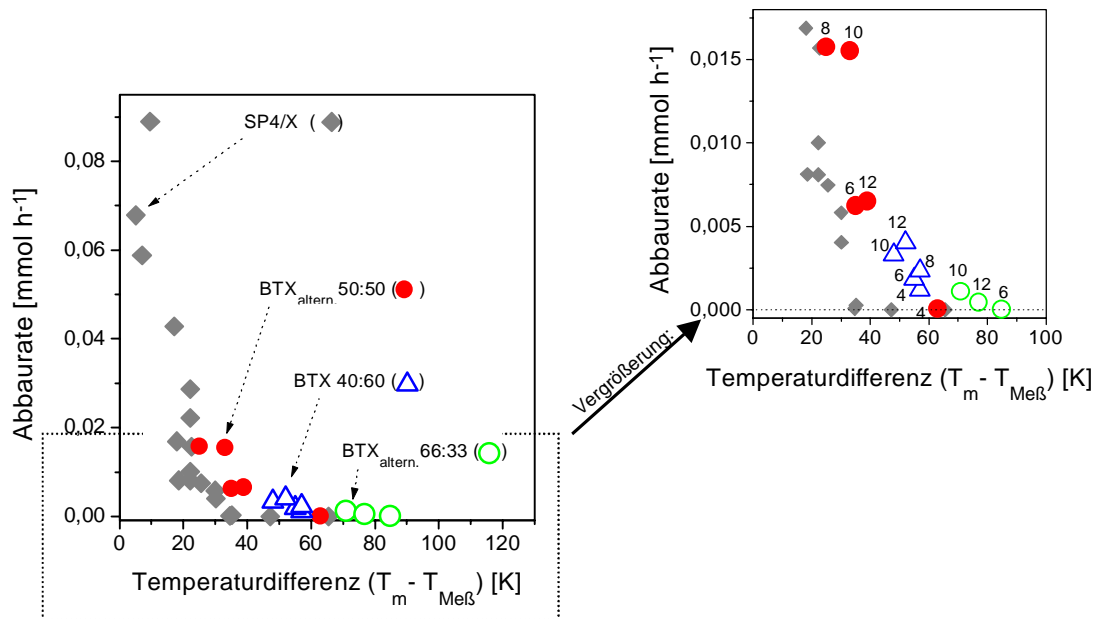


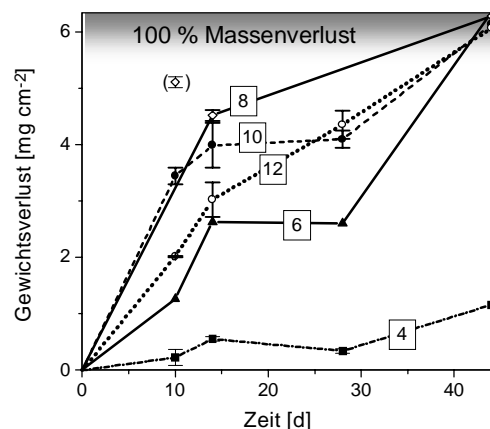
Abb. 4-68: Enzymatische Abbauraten von aliphatischen Homopolyester (SP 4/X) und von aliphatisch-aromatischen Copolyestern (BTX<sub>altern.</sub>50:50, BTX<sub>altern.</sub>66:33, BTX 40:60) in Abhängigkeit von der Differenz zwischen Polyesterschmelz- und Meßtemperatur ( $T_m - T_{Meß}$ ). Im rechten Teil der Graphik ist für die Copolyester die Anzahl der Kohlenstoffatome der aliphatischen Disäurekomponente X angegeben.

Allerdings ist jedoch auch zu erkennen, daß die Abbauraten bei vergleichbaren Schmelztemperaturen mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge der aliphatischen Disäure zunehmen (vgl. die mit blauen Dreiecken markierten Abbauraten der statistischen Copolyester in Abb. 4-68). Dieser untergeordnete Effekt kann mit der erhöhten Kettenbeweglichkeit und einer damit verbundenen erleichterten Einpassung der Ketten in das aktive Zentrum der Lipase erklärt werden.

Auch in bei 50 °C durchgeführten Abbauntersuchungen in Kompost erhöhten sich die Abbaugeschwindigkeiten der statistischen Copolyester BTX<sub>statis.</sub>40:60 mit zunehmender Kohlenstoffkettenlänge der aliphatischen Disäure (Abb. 4-69). Die höchsten Abbaugeschwindigkeiten wurden bei den statistischen Copolyestern jedoch nicht für den Copolyester auf der Basis von Dodecandisäure (C 12-Säure), sondern für die Copolyester mit der aliphatischen C 8- und C 10-Disäure beobachtet.

Abb. 4-69:

Zeitabhängige Abbaukurven in Kompost bei 50 °C von statistischen Copolyestern BTX<sub>statis.</sub> 40:60 mit aliphatischen Disäuren X unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlängen. Die Fehlerbalken ergaben sich aus Doppelbestimmungen.



Als Fazit lässt sich feststellen:

Die Differenz zwischen der Polyesterschmelztemperatur und der Abbautemperatur beeinflusst als Parameter, der die Zugänglichkeit der Polymerketten in den kristallinen Domänen charakterisiert, auch das biologische Abbauverhalten der aliphatisch-aromatischen Copolyester maßgeblich. Dabei ist das thermische Verhalten der Copolyester, unter Berücksichtigung der Ergebnisse der kernspektroskopischen Strukturaufklärung, mit der mittleren aromatischen Sequenzlänge  $\overline{SL}_T$  korreliert.

Voraussetzung für die generelle enzymatische Angreifbarkeit von Polyestern mit aromatischen Sequenzen ist jedoch, daß ein aliphatischer Spacer zwei aromatische Sequenzen trennt. Eine Verlängerung dieses Spacers führt durch Steigerung der Kettenbeweglichkeit zu einem schnelleren Abbau, wobei dieser sterische Effekt jedoch durch dem starken Einfluß der Polyesterschmelztemperatur überlagert wird. Mit dem Einfluß der Länge des aliphatischen Spacers erklären sich auch die unterschiedlichen Abbauraten der aliphatisch-aromatischer Copolyester BTA 40:60 und PTSu 40:60. Bei gleichen Schmelztemperaturen wurde der PTSu-Copolyester (aus 1,3-Propandiol und Bernsteinsäure) mit dem kürzeren aliphatischen Spacer in Kompost etwa 5 mal langsamer als der BTA-Copolyester abgebaut (aus 1,4 Butandiol und Adipinsäure) [Abbaudaten s. KOLPACK 1998].

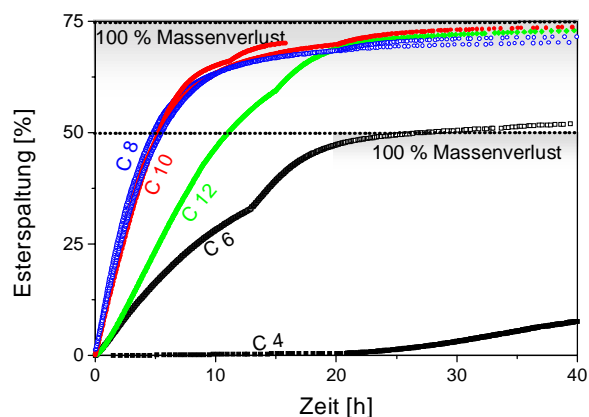
Abbauprodukte des enzymatischen Abbaus:

Da in dieser Arbeit die Abbauprodukte der aliphatisch-aromatischen Copolyester nicht chromatographisch analysiert wurden, ist weder a) eine Vorhersage der genauen Abfolge der Kettenspaltungen an den unterschiedlichen Estergruppierungen noch b) einer Aussage zu den auftretenden Abbauintermediaten möglich.

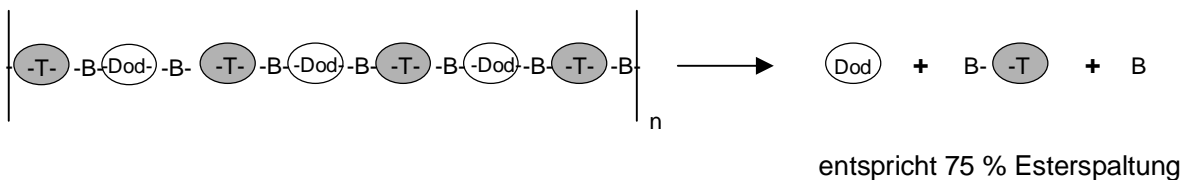
Die quantitative Überführung aller alternierenden Copolyester  $\text{BTX}_{\text{altern.50:50}}$  in wasserlösliche Abbauprodukte gibt jedoch zumindest Hinweise auf die entstehenden Spaltprodukte (Abbaukurven s. Abb. 4-70 und Abb. 8-18 auf Seite 172).

Abb. 4-70:

Enzymatische Abbaukurven (LPs) von alternierenden Copolyestern  $\text{BTX}_{\text{altern.50:50}}$  mit aliphatischen Disäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge (C 4= Bernsteinsäure, C 6= Adipinsäure, C 8= Korksäure (Doppelbestimmung), C 10= Sebacinsäure (Doppelbestimmung), C 12= Dodecandisäure) bei 50 °C.



Für den alternierenden Copolyester  $\text{BTDod}_{\text{altern.50:50}}$  aus 1,4-Butandiol (B), Terephthalsäure (T) und Dodecandisäure (Dod) wurden eine 75 %-ige Spaltung der vorhandenen Esterbindungen gemessen (vgl. grüne Kurve in obiger Abb.). Dieser Abbaugrad kann mit einer Entstehung von 1,4-Butandiol, Dodecandisäure und dem Monoester BT als Abbauprodukte erklärt werden (Abb. 4-71).

Abb. 4-71: Mögliche Abbauprodukte des alternierenden Copolyesters  $\text{BTDod}_{\text{altern.50:50}}$ .

Freie Dodecandisäure sollte entstehen, da auch die Esterbindungen des analogen aliphatischen Homopolyesters SP 4/12 unter den Versuchsbedingungen (PsL, 50 °C) zu

100 % (also zu B und Dod) gespalten werden (Abb. 4-35, Seite 59). Solange Dodecandisäure also noch in Form eines Esters mit einem Butandiolrest verknüpft vorliegt, wird der Ester von der Lipase als Substrat erkannt und hydrolysiert. Neben Dodecandisäure enthält die Repetiereinheit von  $\text{BTDod}_{\text{altern.50:50}}$  (Dod-B-T-B) die aromatische Einer-Sequenz (B-T-B). Diese wurde bereits isoliert bezüglich ihrer enzymatischen Hydrolyse untersucht (Abb. 4-13, Seite 34), wobei die vorhandenen Esterbindungen zu 50 % gespalten wurden, was der Abspaltung eines Butandiol-Restes entspricht. So läßt sich für diesen alternierenden Copolyester eine prozentuale Esterspaltung von 75 %-ige herleiten, die tatsächlich gemessen wurde (vgl. Abb. 4-70).

Im Vergleich zu der oben diskutierten Hydrolyse der alternierenden Copolyester, ist der Abbau der statistischen Copolyester wesentlich komplexer. Bei gleichem Terephthalsäureanteil kommen in statistischen Copolyestern nicht nur aliphatische und aromatische Sequenzen einer einheitlichen Sequenzlänge von  $\overline{\text{SL}}_T = 1$  vor, sondern darüber hinaus auch längere Sequenzen (vgl. Abb. 4-47, Seite 77). Wird bei einem biologischen Abbau die Polymerkette des Copolyesters gespalten, so könnten längere aromatische Sequenzen als nicht oder nur schlecht abbaubare Bestandteile zurückbleiben (aromatische Sequenzen, die aus 3 und mehr Wiederholungseinheiten zusammengesetzt sind,  $\overline{\text{SL}}_T \geq 3$ , machen z.B. in dem Copolyester BTA 45:55 einen Gewichtsanteil von 14 % aus) [WITT et al. 1997]. Für eine aromatische Sequenz mit 3 aromatischen Wiederholungseinheiten konnte mit der verwendeten Lipase von *P. spezie*s nur noch eine sehr langsame Hydrolyse nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4-13, Seite 34). Untersuchungen zum biologischen Abbau des statistischen BTA-Copolyesters mit dem Handelsnamen Ecoflex® (BASF AG) haben jedoch gezeigt, daß der in dem Material organisch gebundene Kohlenstoff unter den Bedingungen einer kontrollierten Kompostierung nahezu vollständig mineralisiert wird (zu ca. 95 %) [WITT et al. 1999]. Der hohe Mineralisierungsgrad läßt vermuten, daß auch längere aromatische Sequenzen der Copolyesterketten mineralisiert werden (bei dem Copolyester BTA 45:55 sind 13,2 % des organisch gebundenen Kohlenstoffs in aromatischen Sequenzen mit einer Sequenzlänge  $\overline{\text{SL}}_T \geq 3$  enthalten). Zum Nachweis einer vollständigen biologischen Abbaubarkeit, wurden Abbauuntersuchungen in wäßrigem Medium mit aus Kompost isolierten Mikroorganismen durchgeführt. In dieser Untersuchung konnte die vollständige Spaltung der Polymerketten zu wasserlöslichen Produkten gezeigt werden, die anschließend durch Zugabe eines Komposteluates rückstandslos metabolisiert wurden [WITT et al. 1999]

## 5 Zusammenfassende Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen sollten klären, welche Parameter bzw. Strukturmerkmale die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit von aromatischen bzw. aliphatischen Homopolyestern sowie von aliphatisch-aromatischen Copolyestern kontrollieren.

Dazu wurden vorwiegend Abbauuntersuchungen an Di-, Oligo- und Polyestern in Laboruntersuchungen mittels einzelner Enzyme (Lipasen) durchgeführt, die prinzipiell gleiche Ergebnisse ergaben, wie mikrobielle Untersuchungen in praxisnahen Testsystemen (Erde bzw. Kompost).

Die für die enzymatischen Untersuchungen eingesetzten Lipasen erwiesen sich dabei als wenig substratspezifisch. So war bei niedermolekularen Modelleestern die Spaltung von Esterbindungen aliphatischer und aromatischer Säuren möglich.

Allerdings wurden die Ester der aromatischen Säuren deutlich langsamer enzymatisch hydrolysiert, als die der aliphatischen oder cycloaliphatischen Säuren. Im Gegensatz zu den niedermolekularen Estern, konnte für die Polyester der aromatischen Säuren (z.B. PBT) kein enzymatischer Abbau nachgewiesen werden.

### Warum werden aromatische Homopolyester nicht enzymatisch hydrolysiert?

- Die enzymatischen Abbauuntersuchungen an den Diestern und Oligoestern zeigen, daß die Esterbindungen von aromatischen Säuren prinzipiell hydrolysierbar sind => keine Spezifität des katalytischen Zentrums der Lipasen für Esterbindungen aliphatischer Säuren.
- Die enzymatischen Abbauuntersuchungen an aromatischen Oligoestern ergaben keinen Hinweis auf einen Endo-Abbau zwischen zwei Terephthalsäuremolekülen.
- Der für Polyester sehr oft in der Literatur [WITT 1996, TOKIWA et al. 1990, TOKIWA et al. 1988, TOKIWA und SUZUKI 1978] angeführte Einfluß des Schmelzpunktes ist nicht der *alleinige* Faktor, der den Abbau der (meistens hochschmelzenden) aromatischen Polyester verhindert. Der ebenfalls aromatische Polyester Polybutylenphenylendiacetat PBPh zeigt, daß auch niedrig schmelzende aromatische Polyester nicht enzymatisch hydrolysiert werden.
- Für Polydodecamethylencyclohexandicarbonat, einen Polyester der cycloaliphatischen Cyclohexandicarbonsäure, konnte nur ein geringer enzymatischer Abbau nachgewiesen werden.

**Fazit:**

Im Gegensatz zu den niedermolekularen Diestern der aromatischen bzw. cycloaliphatischen Säuren, werden strukturell ähnliche Polyester nicht bzw. sehr langsam enzymatisch hydrolysiert. Bei Estern aromatischer bzw. cycloaliphatischer Säuren könnte die Hydrolyse innerhalb der Ketten (Endo-Abbau) durch die verringerte Flexibilität der Polyesterketten verhindert werden.

Lineare aliphatische Homopolyester, deren Kettenflexibilität nicht durch aromatische oder alicyclische Säuren eingeschränkt ist, sollten prinzipiell uneingeschränkt enzymatisch hydrolysierbar sein. Dennoch wurden bei den aliphatischen Polyestern große Unterschiede in den Hydrolysegeschwindigkeiten beobachtet.

**Warum sind aliphatische Polyester hydrolysierbar und was bedingt die Unterschiede in deren Hydrolysegeschwindigkeiten?**

- Die enzymatische Hydrolysierbarkeit aliphatischer Polyester kann grundsätzlich durch hohe Kettenflexibilität erklärt werden: Die Faltung aliphatischer Polyesterketten wird nicht durch kettenversteifende (z.B. aromatisch oder cycloaliphatische) Gruppen behindert, so daß auch ein Endo-Abbau der Ketten grundsätzlich möglich ist.
- Da Polyester mit unterschiedlichen Abständen bzw. Ausrichtungen der Estergruppen enzymatisch hydrolysierbar sind, kann kein dominierender Einfluß einer Stereoselektivität im aktiven Zentrum der Lipase vorliegen. Die betrachteten Lipasen besitzen somit ein relativ breites Substratspektrum.
- Bei Verringerung der Differenz zwischen der Kristallitschmelztemperatur und der Meßtemperatur steigen die enzymatischen Abbauraten der linearen Polyester z.T. stark an (Abb. 4-33, Seite 55). Somit ist für die Abbaugeschwindigkeit der linearen aliphatischen Polyester hauptsächlich das thermische Verhalten der kristallinen Bereiche (Kristallitschmelztemperatur) entscheidend. Dies scheint zunächst im Widerspruch zu Untersuchungen zum biologischen Abbau der linearen Polyester SP 4/4 [YOO und IM 1999] und PCL [MOCHIZUKI et al. 1995, GAN et al. 1997, BENEDICT et al. 1983 a, BENEDICT et al. 1983 b, COOK et al. 1981] zu stehen. Für diese zwei teilkristallinen Polyester wurde gezeigt, daß zunächst die amorphen Bereiche angegriffen werden, deren enzymatische Hydrolyse deutlich schneller erfolgt, als die Hydrolyse der kristallinen Bereiche. Wie kann jedoch das thermische Verhalten der Kristallite die

Abbaugeschwindigkeit der Polyester kontrollieren, wenn primär amorphe Bereiche hydrolysiert werden ? Dieser scheinbare Widerspruch erklärt sich wie folgt:

Die Polymerketten der amorphen Bereiche sind aufgrund der geringeren Ordnung Packungsdichte für enzymatische Hydrolysevorgänge besser verfügbar, als die Ketten der Kristallite, zwischen denen aufgrund der geringen Kettenabstände hohe zwischenmolekulare Anziehungskräfte wirksam sind. Die schnellere enzymatische Hydrolyse der amorphen Bereiche führt zu einer Anreicherung der Kristallite auf der Polymeroberfläche. Anschließend wird die Abbaugeschwindigkeit insgesamt durch den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der enzymatischen Hydrolyse der Kristallite kontrolliert. Durch Steigerung der Umgebungstemperatur wird die Mobilität der Polyesterketten innerhalb der Kristallite und damit deren Möglichkeit in den trogförmigen Zugangsbereich zum aktiven Zentrum der Lipase vorzudringen vergrößert.

Die in der Literatur [WITT 1996, WITT et al. 1995 a, WITT et al. 1995 b, TOKIWA et al. 1990, TOKIWA et al. 1988, TOKIWA und SUZUKI 1981, TOKIWA und SUZUKI 1978, TOKIWA und SUZUKI 1977] oft formulierte Abhängigkeit des Bioabbaus vom Schmelzpunkt der Materialien kann in einer modifizierten und deutlich verfeinerten Korrelation bestätigt werden. Ausschlaggebend ist nicht die absolute Schmelztemperatur, sondern dessen Abstand von der Umgebungstemperatur (=Meßtemperatur) beim Bioabbau. Diese Temperaturdifferenz ist das makroskopische Maß für die Abbaugeschwindigkeit der Polyesterketten in den kristallinen Bereichen. Für alle untersuchten linearen aliphatischen Polyester läßt sich trotz unterschiedlicher Meßtemperaturen eine universelle Kurve für die Abbaugeschwindigkeit als Funktion der auf die jeweilige Polyesterschmelztemperatur bezogenen Temperaturdifferenz  $\frac{T_m - T_{\text{Meß}}}{T_m}$

aufstellen (Abb. 5-1). Aus der Beziehung läßt sich dann für einen beliebigen aliphatischen linearen Polyester unter Kenntnis der Schmelztemperatur abschätzen, mit welcher Geschwindigkeit der enzymatische Abbau erfolgt. Dabei steigt die Abbaugeschwindigkeit nicht linear mit der Temperaturdifferenz. Statt dessen ist bei Temperaturdifferenzen kleiner als 30 °C ein sehr starker Anstieg der Abbaugeschwindigkeit zu verzeichnen (Abb. 4-34, Seite 56).

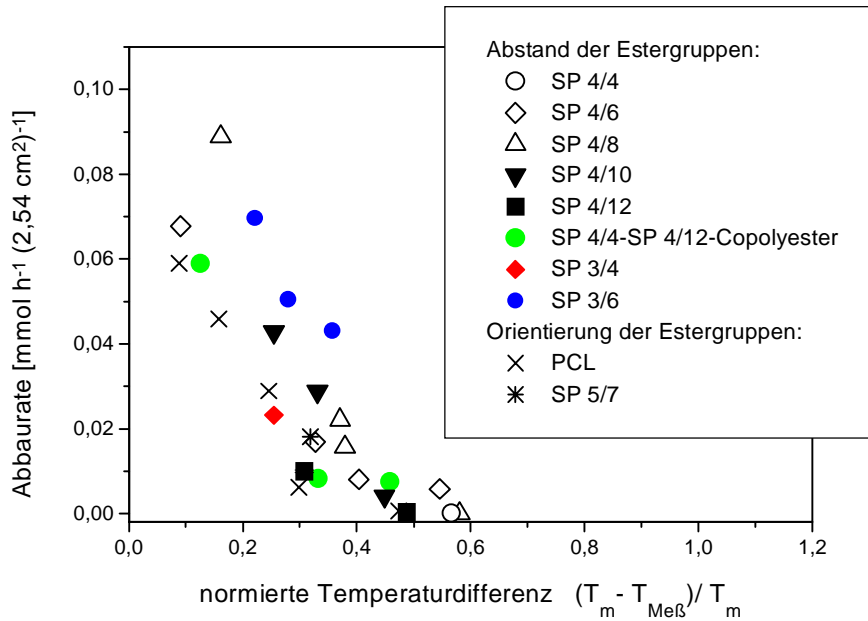


Abb. 5-1: Vergrößerung der enzymatischen Abbauraten mittels Lipase von *P. spezie*s von aliphatischen Polyestern bei Verringerung der auf die Polyesterschmelztemperatur ( $T_m$ ) bezogenen Temperaturdifferenz zwischen der Polymerschmelztemperatur ( $T_m$ ) und der Meßtemperatur ( $T_{Meß}$ ).

- Nicht nur durch eine Anreicherung von Kristalliten, sondern auch durch eine kinetisch bedingte Anreicherungen von monomeren Abbauprodukten (langkettige Disäuren) an der Polymeroberfläche, kann es zu einer Limitierung der Abbaugeschwindigkeit von Polyestern kommen. Dadurch wird die Polymeroberfläche für weitere enzymatische Abbauprozesse inhibiert. Dieser Effekt, der für den verwendeten Enzymtest gezeigt werden konnte, sollte jedoch für Abbauvorgängen unter Umweltbedingungen aufgrund der längeren Abbaueiträume kaum von Bedeutung sein.

Fazit:

Die verwendete Lipase zeigt vom katalytischen Zentrum her ein breites Substratspektrum, so daß alle aliphatischen Polyester prinzipiell abbaubar sein müßten. Die Abbaugeschwindigkeit wird bei den teilkristallinen aliphatischen Polyestern vorwiegend von der Abbaugeschwindigkeit der Kristallite ( $\approx$  Temperaturdifferenz zwischen der Polyesterschmelztemperatur und Meßtemperatur) kontrolliert.

### Warum bauen **verzweigte** aliphatische Polyester langsamer ab, als lineare Polyester?

Ein enzymatischer Abbau des PHB mittels Lipasen wurde in der Literatur bislang nicht beschrieben [MUKAI et al. 1994, MUKAI et al. 1993 b]. Als Begründungen werden die hohe



Kristallinität und die hohe Schmelztemperatur des Polyesters [LENZ 1993] bzw. die vorhandenen Methyl-Seitengruppen angegeben [JAEGER et al. 1995].

Trotz ihrer Analogien im Aufbau des aktiven Zentrums (vgl. Abb. 4-4, Seite 23), unterscheiden sich PHB-Depolymerasen von Lipasen grundsätzlich bezüglich ihres Substratspektrums [SCHIRMER et al. 1993]. Parallelen von Lipasen und PHB-Depolymerasen wurden hingegen bei dem Einfluß der Kristallmorphologie auf die Abbaugeschwindigkeit beobachtet. Analog zu dem enzymatischen Abbau der linearen Polyester SP 4/4 und PCL mittels Lipasen [YOO und IM 1999, MOCHIZUKI et al. 1995, GAN et al. 1997, BENEDICT et al. 1983 a, BENEDICT et al. 1983 b, COOK et al. 1981], werden auch die kristallinen Bereiche des PHB von PHB-Depolymerasen langsamer abgebaut, als die amorphen Bereiche [DOI et al. 1992, PARIKH et al. 1994, PARIKH et al. 1992].

- Im Gegensatz zu PHB wurden niedrigschmelzende synthetische kurzkettenverzweigte Polyesterstrukturen von einer Lipase hydrolysiert [KLEIN 1996]. Im Vergleich zu den analogen linearen Polyestern, war die Abbaugeschwindigkeit der verzweigten Strukturen jedoch deutlich geringer. Die Methylseitengruppen schränken die Flexibilität der Polyesterketten ein, was den Einbau der Polyesterketten in das aktive Zentrum behindern könnte.

Fazit:

Im Vergleich zu linearen Polyesterketten werden die Ketten verzweigter Polyester deutlich langsamer enzymatisch hydrolysiert. Die Einschränkung der Kettenflexibilität nahe der zu hydrolysierenden Esterbindung könnte die für die Spaltung erforderliche Kettenausrichtung am aktiven Zentrum der Lipase behindern.

### **Warum bauen *vernetzte* aliphatische Polyester langsamer ab, als lineare Polyester?**

Zum biologischen Abbau von vernetzten Polyestern gibt es bislang nur wenige Untersuchungen. Mittels Röntgenstrahlung vernetztes SP 4/4 wurde von BAHARI et al. 1998 auf den biologischen Abbau untersucht, während NAGATA et al. 1998 b, NAGATA et al. 1997 a, NAGATA et al. 1997 b, NAGATA et al. 1996 Untersuchungen zum biologischen Abbau von mittels Estergruppen vernetzten Dicarbonsäuren durchführten. Den biologischen Abbau vernetzter PCL-Strukturen analysierte HUANG 1985. Alle Autoren stellten fest, daß die dreidimensionale Netzwerkstruktur die Abbaugeschwindigkeit verringert.

Eine Korrelation von Netzbogenlänge mit dem biologischen Abbauverhalten ist erstmals für die in dieser Arbeit diskutierten vernetzten aliphatischen Polyester möglich. Für alle

untersuchten Netzbogenlängen ( $M_n = 2000$  bis  $20000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) wurde eine starke Reduzierung der Abbaugeschwindigkeiten beobachtet.

Fazit:

Im Vergleich zu linearen Polyesterketten werden die Ketten der vernetzten Polyester deutlich langsamer enzymatisch hydrolysiert. Das Eindringen der Ketten in den trogförmigen Zugangsbereich zum aktiven Zentrum der Lipase könnte durch die Netzknoten behindert werden.

### Was bestimmt das Abbauverhalten aliphatisch-aromatischer Copolyester?

- Das Abbauverhalten und auch das thermische Verhalten der aliphatisch-aromatischen Copolyester korreliert weniger mit der Länge der aliphatischen Sequenzen, als vielmehr mit der mittleren Länge der aromatischen Sequenzen  $\overline{SL}_T$ .
- Der enzymatische Abbau eines bislang nicht beschriebenen aliphatisch-aromatischen Copolyesters mit alternierender Abfolge von aliphatischen und aromatischen Wiederholungseinheiten zeigt, daß Lipasen keine längeren aliphatischen Sequenzen für einen Angriff der Polyesterketten benötigen. Grundsätzlich reicht schon eine aliphatische Unterbrechung (bestehend aus einer aliphatischen Säure und einem Diol) bei aromatischen Polyestern aus, um eine Kettenspaltung zu ermöglichen. Durch den aliphatischen Spacer (Adipinsäure und 1,4-Butandiol) kann die Kette prinzipiell in den trogförmigen Zugangsbereich zum katalytischen Zentrum eindringen und am aktiven Zentrum der Lipase gespalten werden. Durch eine Verlängerung des aliphatischen Spacers kann die Abbaurate geringfügig erhöht werden. Dieser Effekt ist jedoch dem Einfluß der Schmelztemperatur untergeordnet.
- Hauptsächliche Einflußgröße für die Abbaugeschwindigkeit aliphatisch-aromatischer Copolyester ist, wie auch für die aliphatischen Polyester, die Temperaturdifferenz zwischen der Polyesterschmelztemperatur und der Meßtemperatur. Die Copolyester mit unterschiedlicher Mikrostruktur passen sich relativ gut in die für die aliphatischen Polyester aufgestellte Beziehung ein (Abb. 5-2).

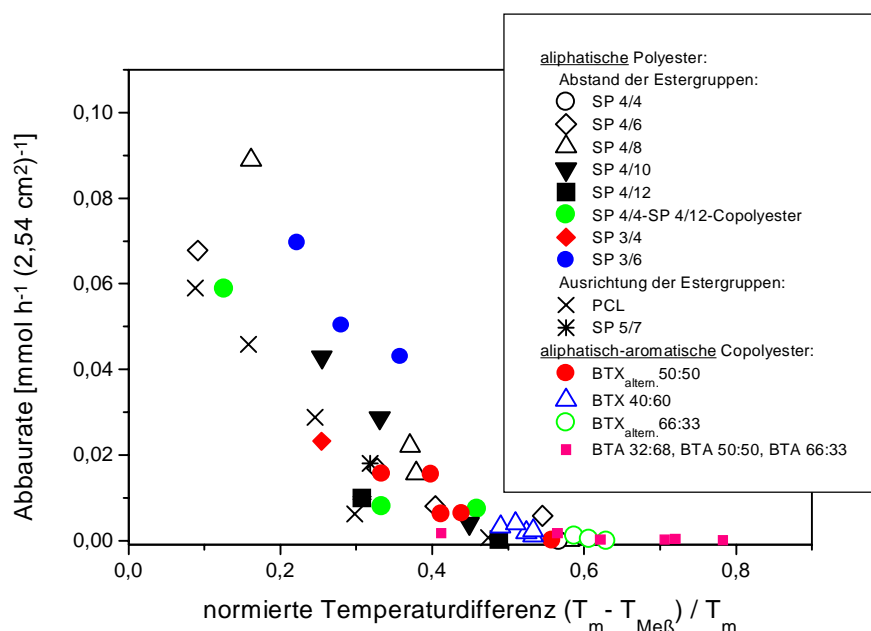


Abb. 5-2: Verringerung der enzymatischen Abbauraten mittels Lipase von *P. spezie*s von verschiedenen aliphatischen Homopolyestern und aliphatisch-aromatischen Copolyestern bei Vergrößerung der auf die Polymerschmelztemperatur ( $T_m$ ) bezogenen Differenz zwischen der Polymerschmelztemperatur ( $T_m$ ) und der Meßtemperatur ( $T_{Meß}$ ).

Das Abbauverhalten der Copolyester korreliert somit weniger mit der Konzentration der aliphatischen Sequenzen. Vielmehr bestimmt die mittlere aromatische Sequenzlänge das Schmelzverhalten und die Hydrolysegeschwindigkeit der Copolyester.

- Die Untersuchungen mit der Lipase von *P. spezie*s legen nahe, daß aromatische Blöcke mit einer Sequenzlänge größer  $\overline{SL}_T > 1$  nur vom Kettenende her verkürzt werden und sich beim Abbau aufgrund der geringen enzymatischen Abbaugeschwindigkeit anreichern können. Hier ist unter realen Umweltbedingungen aber die chemische Hydrolyse sowie das Substratspektrum anderer Enzyme mit in die Betrachtungen einzubeziehen. So wurde auch für die aromatischen Abbauprodukte des kommerziell verfügbaren aliphatisch-aromatischen BTA-Copolyesters der Firma BASF AG (Ecoflex®) eine rückstandslose Metabolisierung nachgewiesen [WITT et al. 1999].
- Bei Block-Copolyestern mit langen aromatischen Sequenzen kann unter Umständen auch von einer Oberflächeninhibierung durch nicht oder nur sehr langsam abbauende aromatische Blöcke ausgegangen werden.
- Die Abbaubarkeit von aliphatisch-aromatischen Blends hängt stark von der Struktur der Blendphasen ab.

**Fazit:**

Die enzymatische Abbaugeschwindigkeit der aliphatisch-aromatischen Copolyester wird hauptsächlich durch die Polyesterschmelztemperatur bestimmt, die ihrerseits eine direkte Funktion der mittleren aromatischen Sequenzlänge ist. Das universelle Modell von der Temperaturdifferenz zwischen Polyesterschmelztemperatur und Meßtemperatur ist somit auch auf die aliphatisch-aromatischen Copolyester anwendbar.

Für alle teilkristallinen Polyester gilt somit:

- ⇒ Der anscheinende Widerspruch zwischen schnell abbauenden amorphen Bereichen und der Korrelation des Abbaus mit Parametern der kristallinen Bereiche läßt sich durch das „Krustenmodell“ erklären, bei dem der Abbau der die Oberflächen verkrustenden und inhibierenden kristallinen Bereich den langsameren, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt.

### Allgemeine Voraussetzungen für den enzymatische Hydrolyse von Polyestern:

Das folgende Schema gibt einen zusammenfassenden Überblick über die wesentlichen Einflußfaktoren für die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit teilkristalliner Polyester.

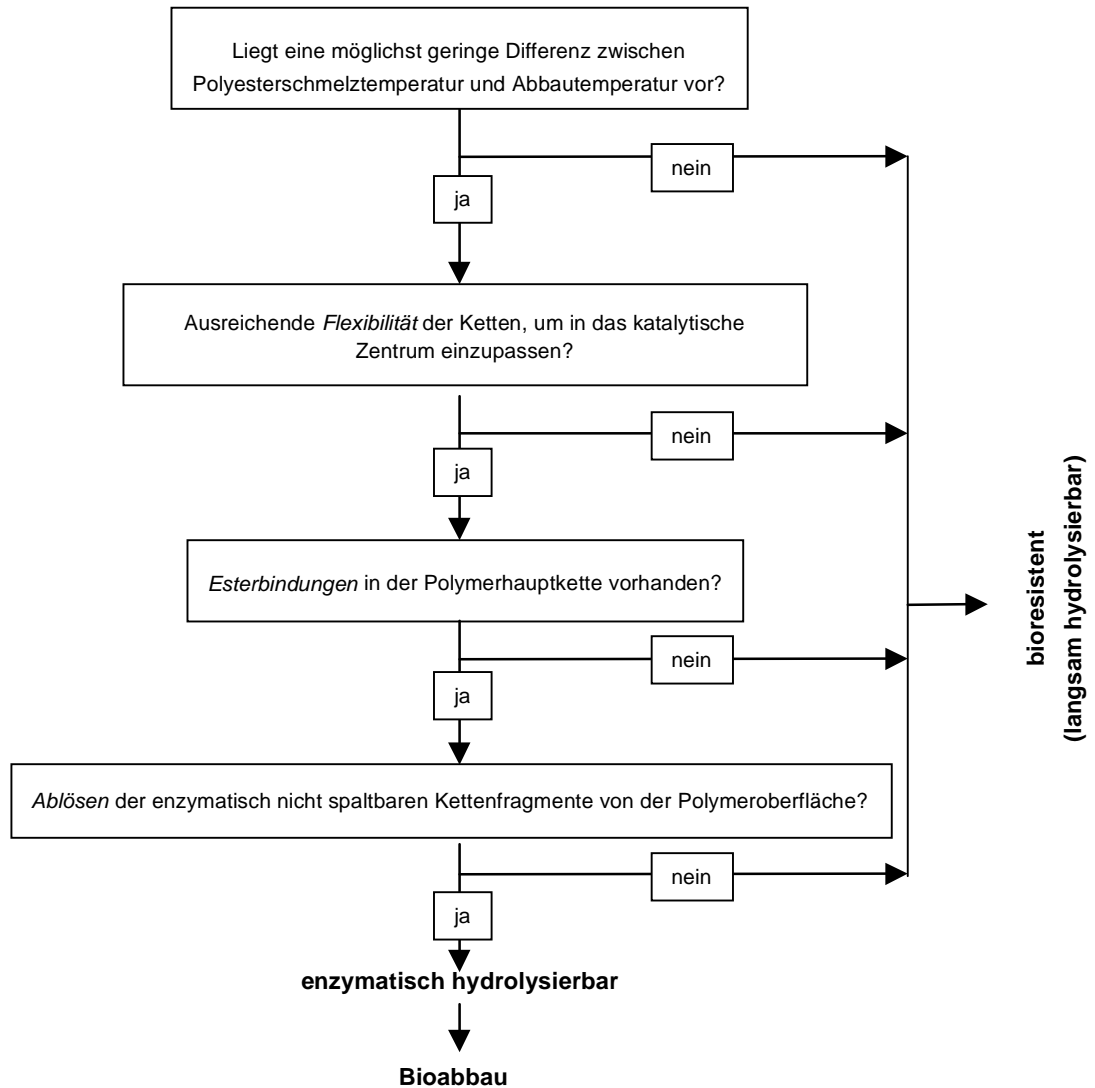


Abb. 5-3: Faktoren, die die enzymatische Hydrolysegeschwindigkeit von Polyestern kontrollieren.



## 6 Experimenteller Teil

### 6.1 Chemikalien und Enzyme

Folgende Chemikalien wurden nach vorheriger Reinigung eingesetzt:

#### *1,3-Propandiol:*

Technisches 1,3-Propandiol wurde durch Destillation über eine Vigreuxkolonne im Membranpumpenvakuum gereinigt (Sdp. 160 °C/ 200 mbar).

#### *Aceton [ORGANIKUM 1990]:*

Die Trocknung des Acetons, das zuvor über Molekularsieb (4 Å) gelagert wurde, erfolgte nach einer dynamischen Methode. Dazu wurde Aceton in einer mit Molekularsieb (4 Å) gefüllten Soxhlett-Aparatur unter Rückfluß gekocht. Das Molekularsieb wurde alle 2 Stunden erneuert.

#### *Zinkdiacetat, wasserfrei [TOKIWA und SUZUKI 1981]:*

$\text{Zn}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2) \cdot \text{H}_2\text{O}$  wurde 4 Stunden bei 140 °C im Trockenschrank gelagert und anschließend im Trockenschrank unter Ölpumpenvakuum gelagert.

Folgende Chemikalien wurden ohne weitere Reinigung eingesetzt:

1,3-Propandiol, 98 %	Riedel-de-Häen
1,4-Butandiol, 99,5 %	Riedel-de-Häen
4-(Dimethylamino)-pyridin, 99 %	Merck
Adipinsäure, 99 %	Fluka
Adipinsäuredimethylester, 99 %	Fluka
Basonat HI 190 B/S: (isocyanuratisiertes Hexamethylendiisocyanat Strukturformel s. Abb. 6-4, Seite 133) 90 % in Solvesso® 100/n-Butylacetat	BASF AG
Benzoessäure, 99,5 %	Fluka
Bernsteinsäure (Succinic acid), 99,5 %	Fluka
Bernsteinsäuredimethylester, 98 %	Fluka
Chloroform, 99 %	Baker
Dichlormethan, 99,5 %	Baker
Dimethylformamid, 99,5 %	Merck
Dodecandisäure; 99 %	Aldrich
Dodecandisäurediethylester, 98 %	Aldrich
Essigsäureanhydrid, 98,5 %	Merck
Ethanol, 99,9 %	Baker

Fumarsäure, 99,5 %	Fluka
Hexamethylendiisocyanat, 99 %	Fluka
Kaliumhydroxidlösung, 0,1 M ethanolisch	Merck
Kaliumhydroxidlösung, 0,5 M ethanolisch	Merck
Methanol, tech	-
Oktandisäure (Korksäure), 98 %	Fluka
Oktandisäuredimethylester, 99 %	Aldrich
Phenylendiessigsäure, 97 %	Fluka
Phenyllessigsäure, 99 %	Fluka
Sebacinsäure (Decandisäure), 99 %	Riedel de Haen
Sebacinsäuredimethylester, 97 %	Fluka
Terephthalsäuredimethylester, 99 %	Fluka
Tetrahydrofuran, 99,7 %	Merck
Tetraisopropylorthotitanat, 95 %	Fluka
Toluol, 99,5 %	Fluka
p-Toluolsulfonsäure, 99 %	Merck
Triphenylphosphat, 98 %	Fluka
Zinkacetat Monohydrat, 99 %	Fluka

## Polyester:

Polybutylenterephthalat PBT, Ultradur B6550 $M_w = 112800$	BASF AG
Polycaprolacton PCL, $M_w = 114000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$	Polysciences

## Enzyme:

Tab. 6-1: Übersicht über verwendete Hydrolasen

Hydrolase (EC <sup>a)</sup> )	Ursprung	Bezugsquelle	Protein-gehalt der Feststoffe	Aktivität (Herstellerangaben)
nicht klassifiziert	<i>Thermomonospora fusca</i> (TfL)	GBF	Lösung, $0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$	-
Lipase (3.1.1.3)	<i>Pseudomonas spezie</i> (PsL)	Sigma	53,6 % (PsL, BSA)	30 Units $(\text{mg}_{\text{Feststoff}})^{-1}$ 56 Units $(\text{mg}_{\text{Protein}})^{-1}$  Aktivität: 1 Unit produziert 1 $\mu\text{mol}$ Glycerin von einem Triglycerid (Olivenöl) pro Minute bei pH 7,0 und 37 °C in der Gegenwart von BSA.



Hydrolase (EC <sup>a)</sup> )	Ursprung	Bezugs- quelle	Protein- gehalt der Feststoffe	Aktivität (Herstellerangaben)
Lipase (3.1.1.3)	<i>Chromobacterium viscosum</i> (CvL)	Sigma	65 %	3580 Units (mg Feststoff) <sup>-1</sup> 6060 Units (mg Protein) <sup>-1</sup>  Aktivität: 1 Unit hydrolysiert 1 Mikroäquivalent Fettsäure von Olivenöl pro Stunde bei pH 7,7 und 37 °C (30 Minuten Inkubation).
Lipase (3.1.1.3)	<i>Rhizomucor miehei</i> (RmL)	Fluka	k.A. <sup>b)</sup>	0,48 Units (mg Feststoff) <sup>-1</sup>  Aktivität: 1 Unit entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol Ölsäure pro Minute bei pH 8,0 und 40 °C freisetzt (Triolein, Fluka-Nr. 62314 als Substrat).
Lipase (3.1.1.3)	<i>Candida cylindracea</i> (CcL)	Fluka	k.A. <sup>b)</sup>	36 Units (mg Feststoff) <sup>-1</sup>  Aktivität: 1 Unit entspricht der Enzymmenge, die 1 µmol Ölsäure pro Minute bei pH 8,0 und 40 °C freisetzt (Triolein, Fluka-Nr. 62314 als Substrat).
Lipase (3.1.1.3)	<i>Wheat germ</i> (WgL)	Sigma	95 %	7,6 Units (mg Feststoff) <sup>-1</sup> 7,6 Units (mg Protein) <sup>-1</sup>  Aktivität: 1 Unit hydrolysiert 1 Mikroäquivalent Fettsäure von Triacetin pro Stunde bei pH 7,4 und 37 °C (60 Minuten Inkubation).
Proteinase (3.4.21)	α-Chymotrypsin aus Rinderpankreas (α-Chym.)	Merck	87,5 %	350 Units (mg Feststoff) <sup>-1</sup> 400 Units (mg Protein) <sup>-1</sup>  Aktivität: N-Acetyl-L-tyrosin-ethylester, pH 8,0, 25 °C
Proteinase (3.4.21.14)	Subtilisin aus <i>Bacillus subtilis</i>	Merck	k.A. <sup>b)</sup>	30 mg Anson-E (mg Feststoff) <sup>-1</sup>  Aktivität: Hämoglobin, pH 7,5, 37 °C
Esterase	Schweineleber	Fluka	Suspension k.A. <sup>b)</sup>	k.A. <sup>b)</sup>

a) Klassifizierung gemäß der Enzyme Commission, z.B. Lipasen = Triglycerol-Acylhydrolasen EC 3.1.1.3.

b) Keine Angaben des Herstellers.

Die kommerziell erhältlichen Lipasen sind durch Zusätze stabilisiert. So enthält das Feststoffpulver der Lipase von *Pseudomonas spezieis* neben dem Protein der Lipase auch Natriumcholat, Saccharose, Magnesiumchlorid, Kaliumphosphat-Puffer und als weiteres

Protein Rinderserumalbumin (BSA). Da der Hersteller in einigen Fällen (Tab. 6-1) nur die Gesamtproteinmenge, jedoch keine Daten über die exakte Enzymproteinmenge angibt (s. z.B. die Angaben für die Lipase von *P. spezie*s in Tab. 6-1), beziehen sich die spezifischen Enzymaktivitäten auf die Gesamtproteinmenge.

Von den Feststoffpulvern der Hydrolasen wurden Stammlösungen (die Lösung der Lipase von *T. fusca* und die Suspension der Esterase von Schweineleber wurden nicht vorverdünnt) in 0,9 %iger Natriumchloridlösung mit einer Proteinkonzentration von 4 mg Feststoff·ml<sup>-1</sup> hergestellt (Lagerung bei -20 °C maximal zwei Monate). Aus den Stammlösungen wurden dann unmittelbar vor den enzymatischen Abbauuntersuchungen Verdünnungen hergestellt, die, zur Vermeidung einer möglichen Aktivitätsabnahme, nicht erneut eingefroren wurden.

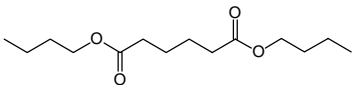
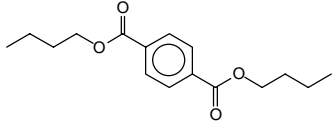
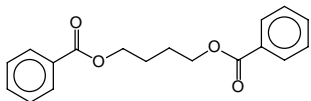
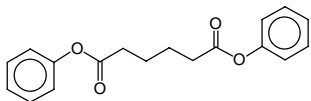
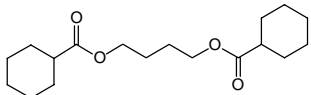
## 6.2 Synthesen

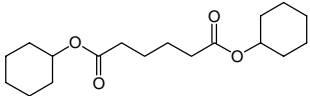
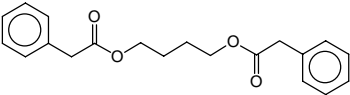
### 6.2.1 Synthese von niedermolekularen Modellestern

#### 6.2.1.1 Aromatische, aliphatische und cycloaliphatische Diester

Die Synthese der in Tab. 6-2 aufgeführten Diester erfolgte zum einen mittels Schmelzkondensation (SK), zum anderen mittels Lösungskondensation (LK) in Gegenwart von Trifluoressigsäureanhydrid.

Tab. 6-2: Strukturen der kondensierten aliphatischen, cycloaliphatischen und aromatischen Modelldiester.

Struktur	Name	Synthese
	Adipinsäure-dibutylester, <u>1</u>	SK
	Terephthalsäure-dibutylester, <u>2</u>	SK
	1,4-Bis(benzoyloxy)-butan, <u>3</u>	SK
	Adipinsäure-diphenylester, <u>4</u>	LK
	1,4-Bis(cyclohexanecarbonyloxy)butan, <u>5</u>	SK

Struktur	Name	Synthese
	Adipinsäure-dicyclohexylester, <u>6</u>	LK
	1,4-Bis(phenylacetoxyl)butan, <u>7</u>	SK

a) Synthese von Modelldiester 1 und 2 am Beispiel von Dibutylterephthalat 2 (SK):

38,8 g Dimethylterephthalat (0,2 mol) wurden in einem Dreihalsrundkolben mit Liebigkühler und Gaseinleitungsrohr mit einem 2,5-fachen Überschuß an 91,5 g 1,4-Butandiol (1,0 mol) und 0,014 g Tetraisopropylorthotitanat (0,025 Gewichts-% der Produktmenge) und 0,014 g Triphenylphosphat eingewogen. Zum Aufschmelzen der Edukte wurde der Ansatz unter Rühren auf 150 °C erhitzt und anschließend für 21 h bei 95 bis 105 °C gehalten.

Der Kolbenrückstand wurde in Chloroform aufgenommen, die Lösung durch Ausschütteln mit 1 M NaOH von Säuren befreit, mit Wasser neutral gewaschen und die organische Phase über Calciumchlorid getrocknet. Nach Entfernung des Chloroforms mittels Rotationsverdampfung wurde das Produkt fraktioniert destilliert (205 °C / 10 mbar).

Zur Herstellung der Modelldiester 3, 4, 5, 6 und 7 wurden anstelle der Säureester die Säuren mit den Alkoholen verestert, da sich nicht umgesetzte Säuren leichter von dem Produkt (Ester) entfernen lassen, als nicht abreagierte Ester.

b) Synthese von Modelldiester 3, 5 und 7 am Beispiel von 1,4-Bis(phenylacetoxyl)butan 7 (SK):

83,1 g Phenyllessigsäure (0,61 mol) sowie eine äquimolare Menge 27,5 g 1,4-Butandiol (0,305 mol) wurden mit 0,55 g p-Toluolsulfonsäure (0,5 Gewichts-%) in einem Dreihalskolben mit Liebigkühler und Gaseinleitungsrohr unter Rühren in einer Stickstoffatmosphäre über 2 Stunden auf 130 bis 140 °C erwärmt. Anschließend wurde für 2 Stunden ein Membranpumpenvakuum von 850 mbar angelegt.

Der Kolbeninhalt wurde mit Chloroform versetzt und mit 1 M Natronlauge ausgeschüttelt, die Chloroformphase abgetrennt und in die 10-fache Menge Methanol eingetropf. Nach 3-stündigem Absetzen der Suspension bei 5 °C wurde nach dem Abdekantieren des Überstandes der Diester abfiltriert und bei 30 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Aromatische Alkohole, wie Phenol, sind aufgrund des aromatischen Ringes wenig nukleophil und folglich reaktionsträge gegenüber Säuren. Nach einer Methode von BOURNE et al. (1949) konnten Phenol in kurzer Reaktionszeit mit Adipinsäure in Gegenwart von Trifluoressigsäureanhydrid verestert werden.

c) Synthese von Modelldiester 4 und 6 am Beispiel von Adipinsäurediphenylester 4 (LK):

5 g Adipinsäure (0,0342 mol) wurden in einem Rundkolben in einer Menge von 14,5 ml Trifluoressigsäureanhydrid (0,07 mol) gelöst. Nach dem Abkühlen des Reaktionsansatzes auf Raumtemperatur wurden 6,44 g (0,0684 mol) Phenol zugegeben und der Ansatz 60 min unter Rückfluß bei 50 °C gekocht.

In den Kolben wurden dann unter Rühren 2 ml Wasser und 20 ml 1 M NaOH gegeben, die Lösung in einen Scheidetrichter mit 50 ml Chloroform versetzt, die organische Phase mit 1 M NaOH gereinigt und mit Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde abgetrennt und in die 10-fache Menge Methanol eingetropft. Nach 3-stündigem Absetzen der Suspension bei 5 °C wurde nach dem Abdekantieren des Überstandes der Diester abfiltriert und bei 30 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

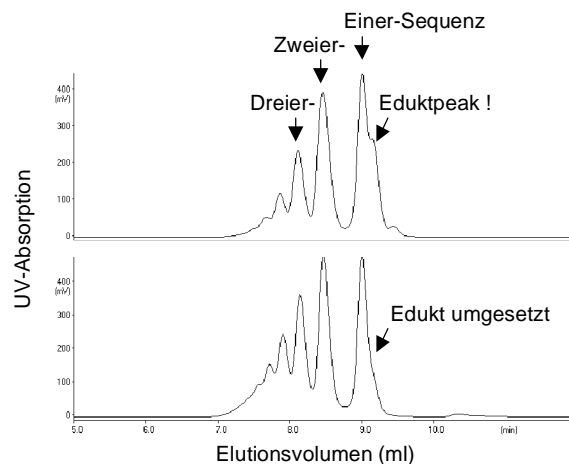
Der bei Raumtemperatur flüssige Diester 1,4-Bis(cyclohexan-carbonyloxy)butan 5 wurde anstelle von Chloroform mit Diethylether ausgeschüttelt, mit 1 M Natronlauge gereinigt und die gewaschene, neutrale organische Phase nach dem Trocknung über  $\text{CaCl}_2$  fraktioniert destilliert.

### 6.2.1.2 Synthese und Isolierung aromatischer Oligoester

a) Synthese von aromatischen Oligoestern [WITT 1996]:

77,676 g Terephthalsäuredimethylester (0,4 mol) wurden mit einem 50 %igen Überschuß an 54,1 g 1,4-Butandiol (0,6 mol) versetzt und unter Zusatz von 0,12 g Zinkacetat-Dihydrat (0,15 Gewichts-%) in der Schmelze bei 160 °C unter Stickstoffatmosphäre kondensiert. Der Kondensationsverlauf wurde mittels GPC (PLgel®, 500 Å) verfolgt und die Reaktion abgebrochen, nachdem das Edukt Dimethylterephthalat (DMT) nahezu vollständig umgesetzt war (s. untere GPC-Spektrum in Abb. 6-1).

Abb. 6-1:  
GPC-Spektren der Oligomersynthese (UV-Detektion, Laufmittel:  $\text{CHCl}_3$ ): Im unteren Chromatogramm ist keine Peakschulter für das Eduktes Dimethylterephthalat (DMT) mehr zu erkennen. Zu diesem Zeitpunkt (nach insgesamt ca. 5 Stunden) wurde die Synthese abgebrochen.



b) Isolierung der aromatischen Oligoester (Einer-, Zweier- und Dreier-Sequenz):

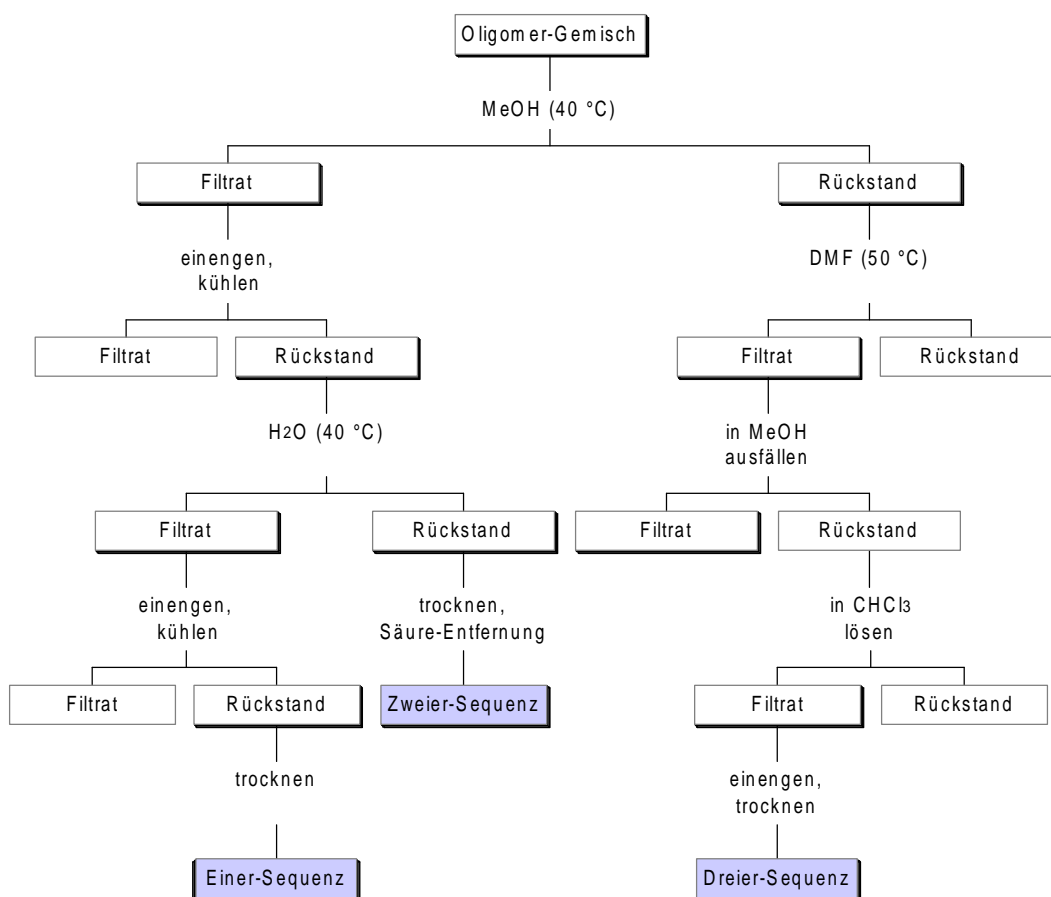


Abb. 6-2: Abtrennung der butandiol-terminierten aromatischen Einer-, Zweier- und Dreier-Sequenz aus dem PBT-Oligomergemisch.

Die Isolation der alkoholterminierten aromatischen Oligoester aus dem Kondensat der Oligomersynthese erfolgte entsprechend des obigen Fließschemas (Abb. 6-2).

#### Separation der aromatischen *Einer- und Zweier-Sequenz*:

Das Kondensat der Oligomersynthese wurde nach dem Abkühlen mehrmals in vorgewärmtem Methanol (40 °C) für jeweils 5 Minuten gerührt und die noch warme Suspension durch einen Faltenfilter abfiltriert, das Filtrat mittels Rotationsverdampfung auf die Hälfte des Anfangsvolumens eingengt und für 2 Stunden bei 5 °C gelagert. Der ausgefallene Feststoff mit der aromatische Einer- und Zweier-Sequenz wurde abfiltriert. Der angetrocknete Feststoff wurde zerkleinert und mehrmals in vorgewärmtem Wasser (40 °C) für jeweils 5 Minuten gerührt und die noch warme Suspension durch einen Faltenfilter abfiltriert.

Der Rückstand (Zweier-Sequenz mit Verunreinigungen an Einer-Sequenz) wurde mehrmals in Wasser (40 °C) gewaschen, bis das GPC-Spektrum des Feststoffs keinen Peak für die aromatische Einer-Sequenz mehr zeigte. Zur Entfernung von Säure-Verunreinigungen wurde der die *Zweier-Sequenz* enthaltende Feststoff in Chloroform gelöst, mit 1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ausgeschüttelt und mit Wasser gewaschen. Die Chloroformphase wurde nach dem Trocknen über  $\text{CaCl}_2$  mittels Rotationsverdampfer einrotiert.

Das Filtrat, das die wasserlösliche *Einer-Sequenz* enthielt, wurde mittels Rotationsverdampfung auf die Hälfte des Anfangsvolumens eingengt und für 2 Stunden bei 5 °C gelagert. Der in der Kälte ausgefallene weiße Feststoff wurde abfiltriert und bei 30 °C unter Vakuum getrocknet.

#### Separation der aromatischen *Dreier-Sequenz*:

Von dem in Methanol (40 °C) unlöslichen Rückstand des kondensierten Oligomergemisches, das die Dreier-Sequenz und längerkettige Oligomere enthielt, wurde ein Aliquot entnommen und mehrmals mit Methanol (40 °C) gewaschen, bis das GPC-Spektrum des Feststoffs keinen Peak für die aromatische Zweier-Sequenz mehr zeigte. Zur Extraktion der aromatischen Dreier-Sequenz wurde der Feststoff 5 min in vorgewärmtem DMF (50 °C) gerührt, die noch warme Suspension durch einen Faltenfilter abfiltriert und das Filtrat in mit Eis gekühltem Methanol ausgefällt. Der ausgefallene angetrocknete Feststoff wurde in Chloroform gelöst, in dem die Dreier-Sequenz, nicht jedoch säureterminierte Oligomere löslich waren. Das Lösungsmittel wurde abrotiert und der Feststoff getrocknet.

Bei den Arbeiten, die bei erhöhter Temperatur durchgeführt wurden (Lösen in vorgewärmten Lösungsmitteln und Einengen mittels Rotationsverdampfer), waren die Aufarbeitungsschritte zur Minimierung von chemischen Hydrolysereaktionen möglichst zügig durchzuführen.

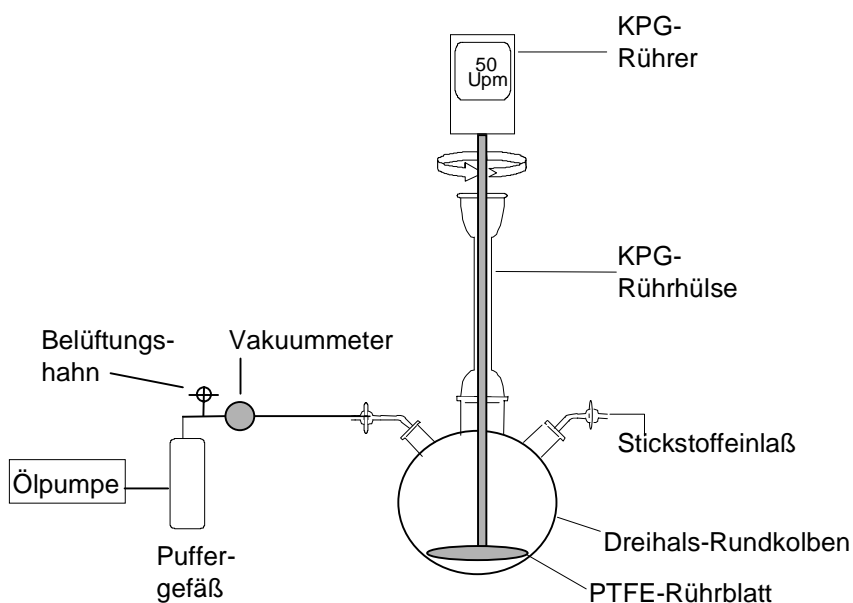
## 6.2.2 Synthese von linearen Polyestern

Die aliphatischen Homopolyester und die statistischen aliphatisch-aromatischen Copolyester wurden in der Schmelze polykondensiert, die alternierenden aliphatisch-aromatischen Copolyester in Lösung polykondensiert. Zur Synthese der aliphatisch-aromatischen Block-Copolyester wurde die entsprechenden Homopolyester in der Schmelze umgeestert.

### 6.2.2.1 Polykondensation in der Schmelze

Die Edukte wurden in Gegenwart eines Umesterungskatalysators auf Temperaturen oberhalb der Schmelztemperaturen der Edukte bzw. des entstehenden Produktes erhitzt. Das Kondensat wurde durch Destillation aus dem Reaktionsgemisch entfernt. Die Schmelzkondensation erfolgte in der in Abb. 6-3 dargestellten Apparatur.

Abb. 6-3:  
Apparatur zur  
Polyestersynthese  
mittels Schmelz-  
kondensation.



Zur Aufrechterhaltung der Äquivalenz der Reaktionspartner mußte zunächst ein zu starkes Abdestillieren der niedrigsiedenden Alkoholkomponente verhindert werden. Daher wurde die Synthese mit niedrigen Temperaturen gestartet und im Laufe der Reaktion die Temperatur langsam gesteigert und der Druck langsam erniedrigt.

a) Synthese von aliphatischen Homopolyestern am Beispiel von SP 4/8:

71,2 g Oktandisäuredimethylester (0,352 mol) und ein 5 %iger Überschuß an 33,3 g 1,4-Butandiol (0,37 mol) wurden mit 0,02 g Tetraisopropylorthotitanat und 0,02 g Triphenylphosphat in einen Dreihalskolben eingewogen, wobei jeder Umesterungskatalysatoren 0,025 Gewichts-% der zu erwartenden Polyestermenge ausmachte. Das Reaktionsgemisch wurde unter Stickstoffatmosphäre und Rühren ( $50 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) innerhalb von 4 Stunden graduell auf 140 bis 150 °C erwärmt. Die Vorlage mit dem Kondensat wurde entfernt und der Druck langsam auf 0,01 mbar verringert, wobei auch das im Überschuß eingesetzte Diol dann abdestillierte. Die Gesamtkondensationszeit betrug ca. 48 Stunden, wonach der Polyester unter Vakuum abgekühlt und anschließend durch Ausfällung aufgereinigt wurde.

b) Synthese von statistischen aliphatisch-aromatischen Copolyestern am Beispiel des BTK 40:60:

Unter Stickstoffatmosphäre wurden 22,72 g Terephthalsäuredimethylester (0,117 mol), 35,49 g Oktandisäuredimethylester (0,176 mol) und ein 5 %iger Überschuß an 27,68 g 1,4-Butandiol (0,307 mol) mit 0,016 g Tetraisopropylorthotitanat und 0,016 g Triphenylphosphat und Rühren ( $50 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) innerhalb von 4 Stunden graduell auf 160 °C erwärmt. Das Kondensat wurde entfernt und der Druck langsam auf 0,01 mbar verringert, wobei auch das im Überschuß eingesetzte Diol abdestillierte. Die Gesamtkondensationszeit betrug ca. 48 Stunden, wonach der Polyester unter Vakuum abgekühlt und anschließend durch Ausfällung (s. Seite 131) aufgereinigt wurde.

c) Synthese von Block-Copolyestern BTA<sub>altern.</sub> 50:50:

Die BTA-Block-Copolyester wurden durch eine Umesterungsreaktion des aliphatischen Polyesters SP 4/6 und des aromatischen Polyesters PBT hergestellt. Dazu wurden 5,006 g SP 4/6 (0,025 mol) zu 5,506 g zuvor geschmolzenem PBT (0,025 mol) und 0,5 Gewichts-% wasserfreiem Zinkacetat gegeben und die Mischung bei 240 °C unter Stickstoffatmosphäre für 20, 30 bzw. 60 Minuten gerührt. Es erfolgte keine Aufreinigung der Block-Copolyester.

d) Synthese des PBT-SP4/6-Blends:

In Abwesenheit eines Katalysators wurden 5,006 g SP 4/6 (0,025 mol) zu 5,506 g geschmolzenen PBT (0,025 mol) und 0,5 Gewichts-% wasserfreiem Zinkacetat gegeben und die Mischung bei 240 °C unter Stickstoffatmosphäre für 10 Minuten gerührt. Der PBT/ SP4/6-Blend wurde nicht aufgereinigt.



### 6.2.2.2 Polykondensation in der Lösung

Zur Vermeidung von Umesterungsreaktionen wurden die alternierenden Copolyester nicht in der Schmelze, sondern in dem indifferenten Lösungsmittel Toluol durchgeführt, das sowohl mit dem entstehenden Kondensat (Wasser) ein azeotrop siedendes Gemisch bildete, als auch die schon gebildeten Esterbindungen durch eine Solvathülle vor einer Umesterungsreaktion schützte.

Synthese der alternierenden aliphatisch-aromatischen Copolyestern am Beispiel von BTK<sub>altern.</sub> 40:60:

8,00 g (0,0258 mol) alkoholverterminierte aromatische Einer-Sequenz wurden mit einer äquimolaren Menge 4,49 g (0,0258 mol) Oktandisäure und 0,12 g p-Toluol-sulfonsäure (1 Gewichts-%) in 70 ml Toluol in einem Zweihals-Rundkolben gelöst. Die Lösung wurde unter Rühren zum Sieden erhitzt ( $Sdp_{\text{Toluol}} = 111\text{ °C}$ ), wobei das gebildete Wasser azeotrop abgeschieden wurde. Nachdem etwa 90 % der theoretischen Wassermenge abgeschieden waren, wurde der Wasserabscheider gegen einen Soxhlet-Extraktor mit einer mit Molekularsieb gefüllten Extraktionshülse ausgetauscht. Die Viskosität der Lösung nahm dabei allmählich zu. Um trotz der zunehmenden Viskosität der Reaktionslösung einen ausreichenden Austrag von gebildetem Wasser zu gewährleisten, wurde der Reaktionslösung absolutes Toluol zur Viskositätsminderung zugesetzt. Im Kondensationsverlauf wurden Proben entnommen und der Anstieg der Molmasse mittels GPC verfolgt. Die Gesamtkondensationszeit betrug 12 bis 18 Stunden, wonach die abgekühlte Lösung in die 10-fache Menge Methanol eingetropfte wurde. Nach 3-stündigem Absetzen der Suspension (bei 5 °C) wurde der Polyester nach dem Abdekantieren des Überstandes abgesogen und bei 30 °C im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

## 6.2.3 Synthese von kettenverlängerten und vernetzten Polyestern

### 6.2.3.1 Synthese von kettenverlängerten Polyestern

Die mittels Schmelzkondensation synthetisierten und mittels Lösungsmittelfällung (s. Kapitel 6.3) aufgereinigten 1,3-Propandiol-basierten Polyester SP 3/4 und SP 3/6, deren Molmassen im Bereich von  $\bar{M}_n = 3000$  bis  $20000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$  lagen, wurden unter Zusatz von Hexamethyldiisocyanat (HDI) zu linearen Poly(ester)urethanen mit unterschiedlicher aliphatischer Segmentlänge umgesetzt.

a) Synthese von kettenverlängerten Polyestern mit Hilfe von HDI:

Jeweils 5 g des für 24 h bei 30 °C vakuumgetrockneten Polyesters wurden in einen 100 ml Dreihals-Rundkolben eingewogen und unter Stickstoffatmosphäre mittels eines auf exakt 180 °C (Temperatur für die anschließende Additionsreaktion) vorgeheizten Heizpilzes aufgeschmolzen. Zu dem flüssigen Polyester wurde die auf dessen Endgruppen bezogene äquimolare Menge an HDI mit einer Glaspipette zupipettiert. Die mittels Titration bestimmten Endgruppenkonzentrationen der Polyester sind in Tab. 8-2 auf Seite 167 angegeben.

Der Ansatz wurde 10 min bei 180 °C mittels eines KPG-Rührers gerührt, anschließend kurz ein Vakuum von 400 mbar angelegt und dann bei 400 mbar abgekühlt. Nach dem Abkühlen wurde der kettenverlängerte Polyester in 50 ml Chloroform gelöst. Anschließend wurde die Lösung zur Aufreinigung unter Rühren in eisgekühltem Methanol ausgefällt. Aufgrund der z.T. niedrigen Schmelzpunkte wurden diesen Polyester bei Raumtemperatur im Vakuum getrocknet.

Für vergleichende Abbauuntersuchungen wurde ein reines Polyurethan hergestellt, für dessen Synthese anstelle des Präpolyesters 1,3-Propandiol als Diolkomponente mit dem Diisocyanat polyaddiert wurde.

b) Synthese eines Polyurethans aus 1,3-Propandiol und HDI:

Zur Herstellung des Polyurethans wurden 7,61 g 1,3-Propandiol (0,1 mol) mit 16,82 g HDI (0,1 mol) in einen 50-ml Rundkolben mit Verzweigungsaufsatz, Mikrodestille, Stickstoffzuleitung und Magnetrührkern mit 10 ml getrocknetem Aceton versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei 110 °C gerührt, wobei das Aceton abdestillierte. Anschließend wurde weitere 15 min bei einem Membranpumpenvakuum von 30 mbar gerührt, um noch vorhandenes Aceton aus dem Ansatz zu entfernen. Das Produkt wurde noch im heißen Zustand aus dem Kolben entnommen und in einer auf 180 °C vorgeheizten hydraulischen Presse (Angaben zum Preßwerkzeug in Kapitel 6.4 ab Seite 134) unter einem Preßdruck von 2 Tonnen für 5 min zu blasenarmen Filmen verpreßt.

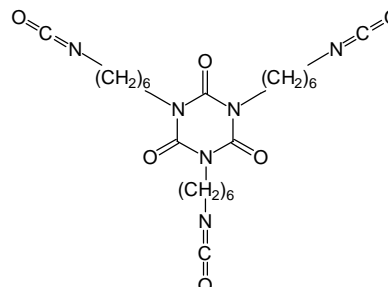
### 6.2.3.2 **Synthese von vernetzten Polyestern**

Vernetzte Polymerstrukturen entstehen zum einen durch die Reaktion von multifunktionellen Monomeren aus einer Stufenwachstumsreaktion oder durch nachträgliche Vernetzung vorgeformter Polymere. Um die biologische Abbaubarkeit in Abhängigkeit von der Struktur zu untersuchen, sollten die Netzwerke hinsichtlich der Struktur möglichst einheitlich sein. Zur Synthese einheitlicher Netzwerke wurden zunächst Präpolyesterketten definierter Länge polykondensiert und nach ihrer Aufreinigung vernetzt [WELZEL 1999].

Dazu wurden 1,3-Propandiol-basierte Polyester SP 3/4 und SP 3/6 mit Molmassen von  $\bar{M}_n = 3000$  bis  $20000 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  unter Zusatz eines trifunktionellen Isocyanates (Basonat HI 190 B/S der Firma BASF AG, Struktur s. Abb. 6-4) zu vernetzten Polyesterurethanen mit unterschiedlichen aliphatischen Segmentlängen umgesetzt.

Abb. 6-4:

Strukturformel von Basonat HI.



Die Herstellung der vernetzten Polyesterurethane erfolgte in zwei Teilschritten. Im ersten Teilschritt erfolgte eine Polyaddition zu einem schwach vernetztem Produkt, wobei die Synthese zur Vermeidung von Durchmischungsproblemen in wasserfreiem Aceton als Lösungsmittel durchgeführt wurde. Das schwach vernetzte zähflüssige Produkt wurde aus dem Reaktionskolben entfernt. Mittels Schmelzpressen wurde die Rohmasse in einem zweiten Teilschritt unter Vervollständigung der Vernetzung zu blasenarmen Filmen verarbeitet.

#### Synthese von vernetzten Polyestern mit Hilfe von Basonat HI:

Jeweils 5 g des für 24 h bei  $30^\circ\text{C}$  vakuumgetrockneten Polyesters wurden in einem 50-ml Rundkolben mit Verzweigungsaufsatz, Mikrodestille, Stickstoffzuleitung und Magnetrührkern in 10 ml trockenem Aceton gelöst. Der Kolben wurde in ein auf  $110^\circ\text{C}$  vorgeheiztes Ölbad gesenkt und mit der auf die Polyesterendgruppen bezogenen äquimolaren Menge an Basonat HI versetzt. Die mittels Titration bestimmten Endgruppenkonzentrationen der Polyester sind in Tab. 8-2 (Seite 167) angegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 15 min bei  $110^\circ\text{C}$  gerührt, wobei das Aceton abdestillierte. Anschließend wurde für weitere 15 min bei einem Membranpumpenvakuum von 30 mbar gerührt, um noch vorhandenes Aceton aus dem Ansatz zu entfernen. Das Produkt wurde noch im heißen Zustand aus dem Kolben entnommen und in einer auf  $180^\circ\text{C}$  vortemperierten hydraulischen Presse (Preßwerkzeug s. Kapitel 6.4, Seite 134) mit einem Preßdruck von 2 Tonnen für 5 min zu blasenarmen Film verpreßt. Es erwies sich als notwendig, die gepreßten Filme unter Druck abkühlen zu lassen, da sie die Form sonst nicht beibehielten.

### 6.3 Aufreinigung der Polyester mittels Lösungsfällung

Zur Entfernung des Katalysators und niedermolekularer Ester wurden die synthetisierten Polyester durch Lösungsfällung aufgereinigt. Hierzu wurden die Polyester in Chloroform gelöst (50 g Polyester pro 100 bis 200 ml Chloroform) und unter starkem Rühren (KPG-Rührer:  $1000 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ) langsam in die 10-fache Menge Methanol eingetropft. Der Niederschlag wurde mit Methanol gewaschen und bei  $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$  im Vakuum ( $< 0,1 \text{ mbar}$ ) getrocknet.

### 6.4 Herstellung von Polyesterfilmen

Um mit definierten Probenkörpern arbeiten zu können, wurden Polyesterfilme durch ein Schmelzpreß-Verfahren hergestellt. Als Preßwerkzeug diente eine hydraulische Presse (Ident.-Nr. 062566, Perkin Elmer) mit zwei thermostatisierbaren Metallplatten und Distanzringen (PIN 15515, Specac, England), die die Filmdicke festlegten. Das Polymermaterial (dickere Filmstücke oder Pulver) wurde zwischen mit Silikon beschichtetem Papier im Preßring auf eine Preßtemperatur erwärmt, die jeweils ca.  $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$  unterhalb der Polyester-Schmelztemperatur lag. Unter Druck (2 Tonnen) wurde das Material 2 min lang zu Filmen gepreßt. Mit Hilfe von Stanzeisen wurden dann Filme mit definierten Durchmessern (und Oberflächengrößen) ausgestanzt.

Tab. 6-3: Durchmesser und angreifbare Filmoberfläche der verwendeten Polymerfilme.

Abbauuntersuchung (Versuchsdurchführung)	Filmdurchmesser	Angreifbare Filmoberfläche
in Erde (Kapitel 6.8.2.1)	2,5 cm	$9,82 \text{ cm}^2$
in Kompost (Kapitel 6.8.2.2)	2,5 cm	$9,82 \text{ cm}^2$
auf Aggarplatten (Kapitel 6.8.2.3)	2,5 cm	$4,91 \text{ cm}^2$
enzymatisch (Kapitel 6.8.1)	0,9 cm (2 Filme)	$1,27 \text{ cm}^2$ ( $2,54 \text{ cm}^2$ )

Die Polymerfilme wurden 2 min in 70 %igem (v/v) Ethanol entfettet, bei Raumtemperatur 24 Stunden im Vakuumtrockenschrank getrocknet und das Gewicht mittels Analysenwaage auf  $\pm 0,3 \text{ mg}$  bestimmt.

## 6.5 Analytik der Syntheseprodukte

### 6.5.1 Gelpermeationschromatographie (GPC)

Die Ermittlung der Molmassen der Reaktionsprodukte erfolgte mittels Gelpermeationschromatographie (GPC) mit Chloroform (entgast und filtriert) als Laufmittel und engverteilten Polystyrolen als Kalibrierstandards.

Probenkonzentration:	Aromatenhaltige Substanzen: 1 mg·ml <sup>-1</sup> aliphatische Homopolyester: 5 mg·ml <sup>-1</sup>
Probenvolumen:	100 µl
Temperatur:	Raumtemperatur (20 bis 25 °C)
Mobile Phase:	Chloroform DMF
Flußrate:	1 ml·min <sup>-1</sup>
Pumpe:	Gynkotek 300 C, Gynkotek, Deutschland
Vorsäule:	PLgel®, 5 guard, 50 x 7,8 mm, Latek, Eppelheim
Trennsäulen je nach Probe:	PLgel®, 300 x 7,8 mm, Latek, Eppelheim
	Laufmittel CHCl <sub>3</sub> : Porendurchmesser: 500 Å (Oligomerbereich) Porendurchmesser: 5·10 <sup>3</sup> Å oder 5·10 <sup>4</sup> Å (Polymerbereich)
Detektor:	RI-Detektor: SDK Shodex RI SE-51 UV-Detektor: Gynkotek SP-6 V

### 6.5.2 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

Zur Bestimmung des thermischen Verhaltens der niedermolekularen Ester und der Polyester wurde das Meßverfahren der Differential Scanning Calorimetry (DSC) eingesetzt (Mettler DSC 12 E mit Mettler Software TA 89 E, Mettler Toledo, Schweiz). Es können dabei Übergangstemperaturen mit den dazugehörigen Wärmekapazitäten bei Glasübergängen bzw. Enthalpien bei Schmelz- und Kristallisationsvorgängen gemessen werden. Die Messungen erfolgten stets mit Heiz- bzw Kühlraten (HR und KR) von 10 °C·min<sup>-1</sup> mit 5-10 mg Probe in einer Stickstoffatmosphäre.

### 6.5.3 Endgruppenbestimmungen

Für die Kettenverlängerungen und Vernetzungen sollten die alkoholendgruppenreichen Polyester, zur Vermeidung von Nebenreaktionen, mit equimolaren Mengen (auf die Endgruppen der Polyester bezogen) der Isocyanate umgesetzt werden. Isocyanate reagieren zwar bevorzugt mit den Hydroxygruppen der Polyester, addieren aber auch an Carbonsäuren. Daher wurden neben den Alkoholendgruppen auch die Säureendgruppen

bestimmt und die Hydroxylzahl (OHZ), als Summe aus Säurezahl (SZ) und der scheinbaren OH-Zahl (sOHZ), gemäß Gleichung (6-1) berechnet.

$$\boxed{\text{OHZ} = \text{sOHZ} + \text{SZ}} \quad (6-1)$$

a) Säure-Endgruppenbestimmung:

Säurezahl (SZ-Zahl): Die Säurezahl gibt diejenige Menge Kaliumhydroxid in mg an, die erforderlich ist, um 1 g der zu untersuchenden Probe zu neutralisieren [DIN 53402].

$$\boxed{\text{SZ} = \frac{(P - B) \cdot t_{\text{Lauge}} \cdot c_{\text{Lauge}} \cdot M_{\text{KOH}}}{m_{\text{Polymer}}}} \quad (6-2)$$

SZ=	Säurezahl [ $\text{mg}_{\text{KOH}}(\text{g}_{\text{Polyester}})^{-1}$ ]
P=	Laugenverbrauch für den Polyester [ml]
B=	Laugenverbrauch für den Blindwert [ml]
$t_{\text{Lauge}}$ =	Titer der Lauge
$c_{\text{Lauge}}$ =	Konzentration der Lauge [ $\text{mol l}^{-1}$ ]
$M_{\text{KOH}}$ =	Molmasse von Kaliumhydroxid $M_{\text{KOH}} = 56,11 \text{ g mol}^{-1}$
$m_{\text{Polymer}}$ =	Einwaage des Polyesters [g]

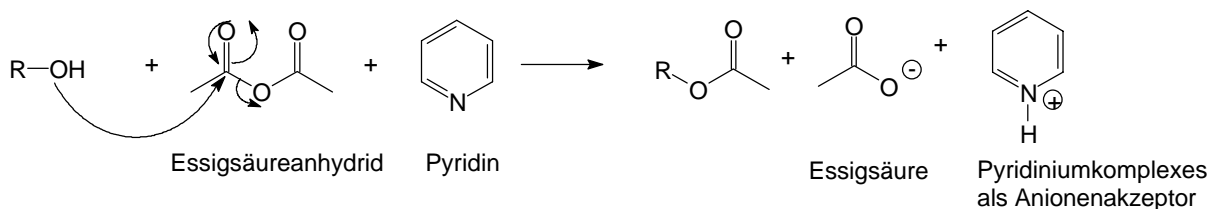
1 g Präpolyester wurde in einem Rundkolben eingewogen und in 50 ml Dimethylformamid gelöst und nach Zusatz von 5 ml Tetrahydrofuran/Ethanol (v/v ,1+1) mit einer 0,1 M ethanolischen KOH-Maßlösung, dessen Titer zuvor bestimmt wurde, titriert (2 ml-Bürette). Der Laugenverbrauch in ml ergab den Wert A. Der Blindwert wurde ohne Polyesterzusatz bestimmt, wobei der Laugenverbrauch in ml den Wert P ergab.

Für die Wendepunkt titrationen wurde eine Autotitrationsanlage (Titra Lab™ 80, Radiometer, Kopenhagen) eingesetzt, die aus einem Titrationsmanager TIM 900, einer Autobürettenstation ABU 901 (2 ml- bzw. 10 ml-Bürette), einer Probenstation SAM 7 und der Auswertungs-Software TIM TALK bestand. Aufgrund der höheren Empfindlichkeit in Gegenwart von organischen Lösungsmitteln, wurde eine kombinierte Vielzweck pH-Elektrode mit LiCl-Ionenbrücke (Radiometer, Kopenhagen) eingesetzt.

b) OH-Endgruppenbestimmung:

Scheinbare Hydroxylzahl (sOH-Zahl): Maßzahl, die angibt, wieviel mg Kaliumhydroxid der Essigsäure-Menge äquivalent sind, die von 1 g Polyester bei der Acetylierung gebunden wird [DIN 53240].

Zur Bestimmung der scheinbaren Hydroxylzahl wurden die Polyester in Gegenwart von Pyridin mit Essigsäureanhydrid umgesetzt und die entstehende Essigsäure mittels einer potentiometrischen Wendepunkttitration quantifiziert.



$$\text{sOHZ} = \frac{(\text{B} - \text{P}) \cdot t_{\text{Lauge}} \cdot c_{\text{Lauge}} \cdot M_{\text{KOH}}}{m_{\text{Polymer}}} \quad (6-3)$$

sOHZ=	scheinbare OH-Zahl [mg <sub>KOH</sub> (g <sub>Polyester</sub> ) <sup>-1</sup> ]
P=	Laugenverbrauch für den Polyester [ml]
B=	Verbrauch Lauge für den Blindwert [ml]
t <sub>Lauge</sub> =	Titer der Lauge
c <sub>Lauge</sub> =	Konzentration der Lauge [mol l <sup>-1</sup> ]
M <sub>KOH</sub> =	Molmasse von Kaliumhydroxid M <sub>KOH</sub> = 56,11 g mol <sup>-1</sup>
m <sub>Polymer</sub> =	Einwaage des Polyesters [g]

1 g Polyester wurde in 15 ml Dichlormethan gelöst. Zu der Lösung wurden 10 ml Katalysatorreagenz (2,5 g 4-(Dimethylamino)-pyridin in 250 ml Dimethylformamid) und 5 ml Acetylierungsreagenz (125 ml Dimethylformamid mit 31,25 ml Essigsäureanhydrid gemischt und mit Dimethylformamid auf 250 ml aufgefüllt) gegeben und 5 Minuten gerührt. Anschließend wurden 10 ml des Hydrolysierungsreagenzes (200 ml Dimethylformamid und 50 ml destilliertes Wasser) zugegeben und weitere 15 Minuten gerührt. Dann wurde mit der 0,5 M ethanolischen KOH-Maßlösung (10 ml-Bürette) titriert, dessen Titer zuvor bestimmt wurde. Der Laugenverbrauch in ml ergab den Wert B. Der Blindwert entsprach dem maximalen Gehalt des Acetylierungsreagenzes an Essigsäure und wurde ohne Polyesterzusatz bestimmt, wobei der Laugenverbrauch in ml den Wert P ergab.

c) Bestimmung des Titers der ethanolischen KOH-Lösungen (0,1 M und 0,5 M):

Zur Bestimmung des Titers der 0,1 M bzw. der 0,5 M ethanolischen KOH-Lösungen (2 ml- bzw. 10 ml-Bürette) wurden 0,5-0,6 g Benzoesäure genau eingewogen, in 10 ml Dimethylformamid gelöst und anschließend mit 40 ml demineralisiertem Wasser versetzt. Diese Lösung wurde mit der zu testenden ethanolischen KOH-Maßlösung bis zum potentiometrischen Wendepunkt titriert.

$$t_{\text{Lauge}} = \frac{m_{\text{Benzoessäure}}}{V_{\text{Lauge}} \cdot 0,001 \cdot c_{\text{Lauge}} \cdot M_{\text{Benzoessäure}}} \quad (6-4)$$

$t_{\text{Lauge}}$	=	Titer der Lauge
$m_{\text{Benzoessäure}}$	=	Einwaage der Benzoessäure [g]
$V_{\text{Lauge}}$	=	Volumen der verbrauchten Lauge [ml]
$c_{\text{Lauge}}$	=	Konzentration der Lauge [mol l <sup>-1</sup> ]
$M_{\text{Benzoessäure}}$	=	Molmasse der Benzoessäure $M_{\text{Benzoessäure}} = 122 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

#### d) Berechnung der Polyesterendgruppen:

Aus der Hydroxylzahl (6-1) lässt sich gemäß der Gleichung (6-5) die Stoffmenge an Endgruppen in einer Polyesteremenge berechnen.

$$n = \frac{m_{\text{Polyester}} \cdot \text{OHZ} \cdot 10^{-3}}{M_{\text{KOH}}} \quad (6-5)$$

$n$	=	Stoffmenge an Polyesterendgruppen pro Gramm Polyester [mol]
$m_{\text{Polyester}}$	=	Einwaage des Polyesters [g]
OHZ	=	OH-Zahl [ $\text{mg}_{\text{KOH}}(\text{g}_{\text{Polyester}})^{-1}$ ]
$M_{\text{KOH}}$	=	Molmasse von Kaliumhydroxid $M_{\text{KOH}} = 56,11 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$

Die mittlere Molmasse als Zahlenmittel  $\bar{M}_n$  errechnet sich aus Gleichung (6-6).

$$\bar{M}_n(\text{berechnet}) = \frac{2 \cdot M_{\text{KOH}}}{\text{OHZ} \cdot 10^{-3}} \quad (6-6)$$

$\bar{M}_n(\text{berechnet})$	=	berechnete mittlere Molmasse als Zahlenmittel [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$M_{\text{KOH}}$	=	Molmasse von Kaliumhydroxid $M_{\text{KOH}} = 56,11 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$
OHZ	=	OH-Zahl [ $\text{mg}_{\text{KOH}}(\text{g}_{\text{Polyester}})^{-1}$ ]

Die Ergebnisse der Berechnungen sind in Tab. 8-2 zusammengefasst.

### 6.5.4 Charakterisierung der vernetzten Polyester

Die in Chloroform unlöslichen vernetzten Poly(ester)urethane wurden hinsichtlich ihres Quellungsgrades und des extrahierbaren Anteils charakterisiert. Die Quellungsversuche wurden in Chloroform durchgeführt, wobei der Quellungsgrad das Lösungsmittelvolumen angibt, das von 1 g Polyester aufgenommen werden kann (6-7).



$$\text{Quellungsgrad} = \frac{(m_{\text{gequollen}} - m_{\text{trocken}})}{\rho_{\text{CHCl}_3} \cdot m_{\text{trocken}}} \quad (6-7)$$

$m_{\text{gequollen}}$  = Gewicht des gequollenen Films [g]

$m_{\text{trocken}}$  = Gewicht des trockenen Films nach der Quellung [g]

$\rho_{\text{CHCl}_3}$  = Dichte von Chloroform  $\rho_{\text{CHCl}_3} = 1,48 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$

Der extrahierbare Anteil umfaßt den prozentualen Anteil an Polymerketten, der nicht in das Netzwerk eingebunden wurde, und somit in dem Lösungsmittel (Chloroform) löslich war (6-8).

$$\text{extrahierbarer Anteil} = \frac{(m_{\text{original}} - m_{\text{trocken}})}{m_{\text{original}}} \cdot 100\% \quad (6-8)$$

$m_{\text{original}}$  = Gewicht des Films vor der Quellung [g]

$m_{\text{trocken}}$  = Gewicht des trockenen Films nach der Quellung [g]

Druchführung:

Zur Bestimmung des Quellungsgrades und des extrahierbaren Anteils wurden von den vernetzten gepreßten Filmen einheitliche Probenkörper ( $\varnothing$  2,5 cm) ausgewogen ( $m_{\text{original}}$ ) und je ein Film für 12 Stunden in 40 ml Chloroform gelagert. Anschließend wurden die Filme mit Hilfe einer Fritte vom Lösungsmittel getrennt. Die Masse der noch feuchten Filme wurde anschließend sofort bestimmt ( $m_{\text{gequollen}}$ ) und die Filme nach 24-stündiger Trocknung bei Raumtemperatur erneut ausgewogen ( $m_{\text{trocken}}$ ).

### 6.5.5 $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie

Die aliphatisch-aromatischen Copolyester wurden mittels  $^{13}\text{C}$ -Kernresonanzspektroskopie charakterisiert. Dazu wurden die Polyester in deuteriertem Chloroform oder Trifluoressigsäure TFA gelöst (ca.  $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) und bei einer Meßfrequenz von 300, 400 bzw. 600 MHz vermessen. Bei Verwendung von TFA (Quartett: 119,3, 117,4, 115,5 und 113,7 ppm, Quartett: 164,2, 163,9, 163,6, 163,4 ppm) wurde als Referenzsubstanz zur Fixierung des Nullpunktes Trimethylsilan (Singulett: 0 ppm) eingesetzt. Bei den Messungen in Chloroform wurde das  $^{13}\text{C}$ -Signal von Chloroform bei 77,05 ppm (Triplett: 76,8, 77,05 und 77,3 ppm) als Referenz herangezogen.

Die  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden gemäß Abb. 4-49 (Seite 79) im Bereich der zwei mittleren Kohlenstoffatome des Butandiols der Polyesterkette (chemischen Verschiebung von 26,2 bis

27,1 ppm) gespreizt. Entsprechend der Gleichungen (4-9), (4-10) bis (4-13) (ab Seite 81) wurde der prozentuale Anteil an Terephthalsäure und der zweiten Disäure X ( $M_T$  und  $M_X$ ), die mittleren Sequenzlängen ( $\overline{SL}_T$  und  $\overline{SL}_X$ ) und der Unordnungsgrad  $U_R$  berechnet.

## 6.6 Bestimmung von Löslichkeiten

Zur Bestimmung der Löslichkeit der aliphatischen Disäuren, deren Salze und der aromatischen Oligoester (Einer-, Zweier- und Dreier-Sequenz) wurden gesättigte Lösungen hergestellt und der gelöste Teil nach dem Entfernen des Lösungsmittels gravimetrisch bestimmt. Die Natriumsalze der aliphatischen Disäuren, deren Löslichkeit bestimmt werden sollte, wurden durch Neutralisation der entsprechenden Säuren hergestellt.

### a) Herstellung der Natriumsalze von aliphatischen Disäuren:

80 g Disäure (1,1 mol Protonen bei Adipinsäure bzw. 0,69 mol Protonen bei Dodecandisäure) wurden in einem 500 ml Rundkolben mit 100 ml dest. Wasser und 3 Tropfen Methylrot-Lösung (200 mg in 110 ml Ethanol (98 %) und 10 ml Wasser gelöst) versetzt und mit 5 M NaOH (130 ml  $\cong$  0,65 mol Hydroxid-Ionen) bis vor den Farbumschlag des Indikators von rot nach gelb titriert. Mit Hilfe eines Autotitrationssystems mit 1 M NaOH erfolgte eine Endpunkt-Titration auf den pH-Wert von 7,0. Nach dem Entfernen des Wassers mittels Rotationsverdampfer wurde das Natrium Salz aus dem Kolben entfernt und dessen Löslichkeit bestimmt.

### c) Bestimmung der Löslichkeit der Säuren, Salze und aromatischen Oligoester:

In eine Schottflasche mit destilliertem Wasser (zur Bestimmung der Löslichkeit der Salze wurde 80 ml Wasser vorgelegt, zur Bestimmung der Löslichkeit der aromatischen alkoholterminierten Oligoester (Struktur s. Tab. 4-4, Seite 34) und der Säuren wurden 200 ml Wasser vorgelegt) und einem Magnetkern wurde soviel von der zu untersuchenden Substanz eingerührt, bis eine gesättigte Lösung mit Bodenkörper entstand. Die Lösung wurde bei einer Temperatur von 4, 30, 37, 50 bzw. 55 °C für jeweils 24 Stunden gerührt und solange mit weiterer Substanz (Salz, Säure bzw. aromatischem Oligoester) versetzt, bis der Substanzüberschuß einen bleibenden Bodenkörper bildete. Bei der jeweiligen Umgebungstemperatur wurde die gesättigte Lösung durch zwei übereinanderliegende Faltenfilter (Schwarzbandfilter 589<sup>1</sup>, Schleicher und Schüll) in einen zuvor leer gewogenen Rundkolben ( $m_{\text{leer}}$ ) filtriert und der befüllte Kolben erneut gewogen ( $m_{\text{Lösung}}$ ).

Der mit der Lösung gefüllte Kolben wurde durch Eintauchen in ein Methanol-Kältebad bei -18 °C unter Drehen des Kolbens eingefroren und die gefrorene Lösung beim Auftauen für

24 bis 48 Stunden im Ölpumpenvakuum gefriergetrocknet. Der Kolben mit der getrockneten Substanz wurde erneut ausgewogen ( $m_{\text{Substanz,trocken}}$ ) und die Löslichkeit  $L$  gemäß Gleichung (6-9) berechnet.

200 ml des eingesetzten destillierten Wassers (Blindwert) ergaben nach der Gefriertrocknung keinen nachweisbaren Feststoffrückstand.

$$L = \frac{(m_{\text{Substanz,trocken}} - m_{\text{leer}}) \cdot 100}{(m_{\text{Lösung}} - m_{\text{leer}}) - (m_{\text{Substanz,trocken}} - m_{\text{leer}})} \quad (6-9)$$

$L =$	Löslichkeit in 100 g dest. Wasser [ $\text{g (100 g)}^{-1}$ ]
$m_{\text{Substanz,trocken}} =$	Gewicht des Kolbens mit der getrockneten Substanz [g]
$m_{\text{leer}} =$	Gewicht des leeren Kolbens [g]
$m_{\text{Lösung}} =$	Gewicht des Kolbens mit der Lösung [g]

Um eine mögliche rein chemische Hydrolyse der aromatischen, alkoholterminierten Oligoester (Einer-, Zweier- und Dreier-Sequenz) zu vermeiden, wurden die Feststoffe in diesen Fällen direkt in vortemperiertes destilliertes Wasser eingerührt und anschließend für nur eine Stunde gerührt.

## 6.7 Bestimmung der Auflösegeschwindigkeit der Carbonsäuren

Die Auflösegeschwindigkeit von verschiedenen aliphatischen Dicarbonsäuren (Bernsteinsäure, Adipinsäure, Korksäure, u.a.) und der zwei aromatischen Monocarbonsäuren (Benzoessäure, Phenyllessigsäure) wurden unter identischen Bedingungen wie bei den enzymatischen Abbauuntersuchungen bestimmt. Dazu wurden gleiche Massen (8 mg) der zuvor gesiebten Säurepulver (Partikeldurchmesser 0,2-0,3 mm) in einem 10 ml-Glasgefäß (Höhe: 5,5 cm, Durchmesser: 1,8 cm) vorgelegt. Um ein Aufschwimmen der längerkettigen, hydrophoben Disäuren (Sebacinsäure, Dodecandisäure) bei der Wasserzugabe zu vermeiden, mußte eine grenzflächenaktive Substanz zugegeben werden. Das Aufschwimmen der Säuren konnte durch Zugabe einer Lipaselösung verhindert werden (0,256  $\mu\text{l}$  einer PsL-Lösung mit einer Konzentration von  $4 \text{ mg}_{\text{Feststoff}} \text{ ml}^{-1}$ , diese Enzymmenge entsprach den enzymatischen Abbauuntersuchungen). Anschließend wurden 5,744 ml 0,9 %ige Natriumchloridlösung zugesetzt und die Auflösegeschwindigkeit der Säuren durch Aufnahme einer Neutralisationskurve unter den Bedingungen des enzymatischen Abbautests (pH-Stat Titration bei pH 7,0; Laugenkonzentration 0,1 M Natronlauge; Magnetprührer mit einer Rührgeschwindigkeit von  $800 \text{ U} \cdot \text{min}^{-1}$ ; Magnetkern einer Länge von 0,9 cm und Breite von 0,2 cm) bestimmt.

## 6.8 Abbauuntersuchungen

### 6.8.1 Enzymatische Abbauuntersuchungen

Bei den enzymatischen Abbautests wurden die bei der Spaltung der Esterbindungen entstehenden Säuren mittels Titration mit einem Autotitrationssystem (pH-Stat-Titrationssystem von Radiometer, Kopenhagen Dänemark, bestehend aus einer Autobürette ABU 901 und einer Kontrolleinheit PHM 290) bei pH 7 ermittelt, wobei der Laugenverbrauch ein direktes Maß der Enzymreaktion war.

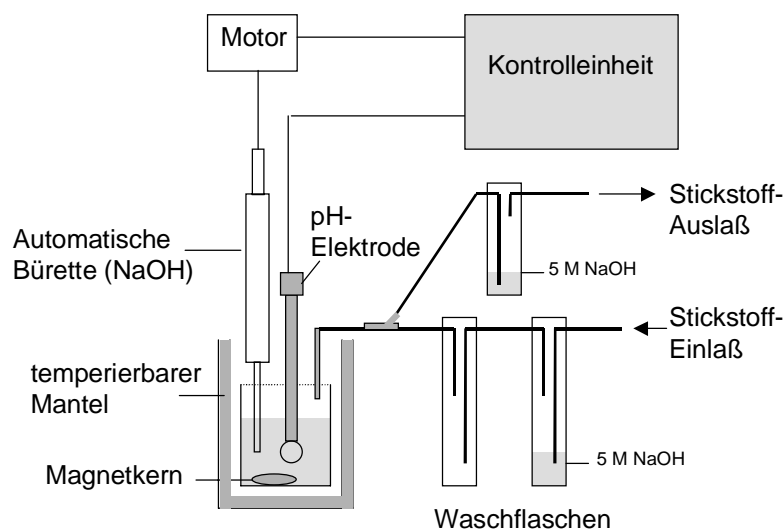


Abb. 6-5: Versuchsaufbau zum enzymatischen Abbauersuch mittels pH-Stat-Titration.

Als Reaktionsgefäß diente ein thermostatisierbares 10 ml Schnappdeckelgefäß (Höhe: 5,5 cm, Durchmesser: 1,8 cm), durch dessen Gummideckel für die Zugabe der Natronlauge eine Kanüle und die pH-Elektrode (U 402-M6-S7/100, Ingold, Urdorf/ZH, Schweiz) direkt in die Reaktionslösung geführt wurden. Eine weitere Kanüle, dessen Spitze oberhalb der Reaktionslösung fixiert wurde, leitete kontinuierlich Stickstoff über die Reaktionslösung, was das Eindringen von sauer reagierendem Kohlendioxid in die Reaktionslösung verhinderte.

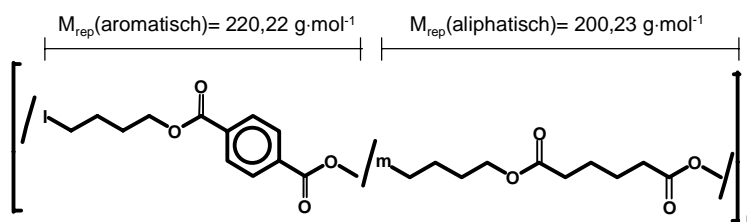
Alle Geräte, die mit der Reaktionslösung in Kontakt kamen, wurden durch vorheriges Spülen mit Aceton und 70 %iger wäßriger Ethanol-Lösung von Fetten befreit. Die Durchmischung der Reaktionslösung erfolgte mit Hilfe eines kleinen Magnetrührkerns (Länge: 0,9 cm, Durchmesser: 0,2 cm) unter Verwendung eines Magnetrührers (Rührgeschwindigkeit: 800 U·min<sup>-1</sup>). Mittels eines Temperiermantels (doppelwandiger Glasreaktor mit angeschlossenem Thermostat M3, mgw Lauda, Lauda-Königshofen) wurde eine konstante Meßtemperatur erzielt.

Der pH-Wert wurde durch automatische Laugenzugabe bei einem Wert von 7,0 gehalten. Die Zudosierung erfolgte über eine proportionale Regelung (PID), die bei geringer Gefahr des Übertitrierens eine rasche Antwort des Systems ermöglichte. Der Verdünnungsgrad der Lauge (0,01 bis 0,1 M) wurde so gewählt, daß sich das Probenvolumen während der Enzymreaktion maximal um 2 ml vergrößerte.

#### Berechnung der Esterspaltung:

Aus dem Laugenverbrauch während der Enzymreaktion konnte die Anzahl der gespaltenen Esterbindungen des Substrates berechnet werden. Die Rechnung wird nachfolgend exemplarisch am Beispiel des Copolyesters BTA 40:60 verdeutlicht. Für diese aliphatisch-aromatischen Copolyester berechnet sich eine mittlere Molmasse für die aliphatisch-aromatische Repetiereinheit unter Berücksichtigung der Zusammensetzung (Abb. 6-6).

Abb. 6-6:  
Berechnung der  
mittleren Mol-  
masse für die  
Repetiereinheit  
von BTA 40:60.



BTA 40:60 mit l = 40 % und m = 60 %:

$$M_{\text{rep}}(\text{BTA 40:60}) = (0,4 \cdot 220,22 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}) + (0,6 \cdot 200,23 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}) \\ = 208,23 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$$

Eine aliphatisch-aromatische Repetiereinheit von BTA 40:60 besitzt bei einer mittleren Molmasse  $M_{\text{Rep}} = 158,2 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$  zwei Esterbindungen  $\text{EB}_{\text{Rep}}$ , so daß sich die theoretisch möglichen Esterspaltungen gemäß Gleichung (6-10) berechnen.

$$\boxed{\text{ES}_{\text{th}} = \frac{m_v}{M_{\text{Rep}}} \cdot \text{EB}_{\text{Rep}}} \quad (6-10)$$

$\text{ES}_{\text{th}} =$	theoretisch vorhandene Estergruppen [mmol]
$m_v =$	Substratmasse vor dem Abbau [mg]
$M_{\text{Rep}} =$	Molekulargewicht einer Repetiereinheit [ $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ ]
$\text{EB}_{\text{Rep}} =$	Anzahl von Esterbindungen in einer Repetiereinheit

Unter Berücksichtigung der Stoffmengenkonzentration der Lauge  $c_{\text{Lauge}}$  kann der theoretisch benötigte Laugenverbrauch für die Spaltung aller vorhandenen Esterbindungen gerechnet werden (6-11).

$$V_{th} = \frac{ES_{th}}{c_{Lauge} \cdot t_{Lauge}} \quad (6-11)$$

$V_{th}$ = theoretisch benötigtes Laugenvolumen [ml]  
 $ES_{th}$ = theoretisch vorhandene Estergruppen [mmol]  
 $c_{Lauge}$ = Konzentration der Lauge [ $\text{mol l}^{-1}$ ]  
 $t_{Lauge}$ = Titer der Lauge

Das molare Verhältnis von tatsächlich aufgetretenen Esterspaltungen zu theoretisch vorhandenen Estersbindungen liefert bei Multiplikation mit dem Faktor 100 den prozentualen Wert der eingetretenen Esterspaltungen (6-12).

$$ES(\%) = \frac{ES_{exp}}{ES_{th}} \cdot 100\% \quad (6-12)$$

$ES(\%)$ = Anteil gespaltener Esterbindungen [%]  
 $ES_{exp}$ = tatsächlich gespaltene Esterbindungen [mmol]  
 $ES_{th}$ = theoretisch vorhandene Esterbindungen [mmol]

Die Betrachtung der eingetretenen Esterspaltungen innerhalb eines bestimmten Zeitraumes führt zu einer spezifischen Abbaurrate (6-13).

$$AR_{enz} = \frac{\Delta ES_{exp}}{\Delta t} \quad (6-13)$$

$AR_{enz}$ = spezifische Abbaurrate [ $\text{mmol h}^{-1}$ ]  
 $\Delta ES_{exp}$ = gespaltene Estergruppen im Zeitraum  $\Delta t$  [mmol]  
 $\Delta t$ = betrachteter Zeitraum [h]

### 6.8.1.1 Abbau niedermolekularer Modellester (Öle)

Die Modellester Dibutyladipat 1 und Dibutylterephthalat 2 lagen bei den Meßtemperaturen von 37 °C als Öle vor. Im Enzymtest wurden die flüssigen Substrate in wäßrigem Millieu nach einer standardisierte Methode von NOVO INDUSTRI emulgiert.

Emulsionslösung: 4,475 g NaCl, 0,103 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 190 g Glycerin (87 %) wurden in einem 250 ml Meßkolben unter Rühren gelöst und anschließend langsam 1,5 g Gummi Arabicum als Emulgator hinzugefügt. Mittels destilliertem Wasser wurde auf 250 ml aufgefüllt und die Lösung für 2 h gerührt. Diese Lösung ist bei Raumtemperatur einen Monat haltbar.

Substratlösung: 0,4 ml des öligen Substrates wurden mit 4 ml der Emulsionslösung und 3,6 ml destilliertem Wasser versetzt. Dieses Gemisch wurde direkt vor seinem Einsatz im Enzymtest angesetzt und mittels Ultra-Turrax (TP 25, Jahnke & Kunkel KG, IKA-Werk, Staufen i. Breisgau) 1 min bei 13500 Upm homogenisiert.

In dem 10-ml Reaktionsgefäß wurden 5,5 ml Substratlösung vorgelegt und unter Rühren 3 min temperiert. Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 wurden 500 µl der Lipaselösung, z.B. Lipase von *P. spezies* mit einer Protein-Konzentration von 0,0214 mg·ml<sup>-1</sup> (Gesamtproteinmenge je Ansatz: 10,7 µg), zupipettiert und die pH-Stat Titration gestartet. Die Enzymaktivität wurde aus der Anfangssteigung (2 bis 15 min) der linearen Abbaukurven bestimmt.

Zur Untersuchung von Temperaturstabilität, Temperatur- und pH-Optimum der Lipase von *P. spezies* wurde die oben angegebene Protein-Konzentration von 0,0214 mg·ml<sup>-1</sup> eingesetzt. Temperaturstabilität und –optimum der Lipase von *T. fusca* wurden mit einer Proteinkonzentration von 0,0078 mg ml<sup>-1</sup> (Gesamtproteinmenge je Ansatz: 3,9 µg) bestimmt.

#### Temperaturstabilität der Lipasen:

Zur Bestimmung der Temperaturstabilität der Lipasen von *P. spezies* und *T. fusca* wurden jeweils 500 µl der Lipaselösung der obigen Proteinkonzentration in einem Eppendorf-Cup bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen (PsL: 30, 37, 50 und 55 °C bzw. TfL: 55 °C) in einem Thermomixer (5436, Eppendorf, Hamburg) mit 900 U min<sup>-1</sup> geschüttelt. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurden Cups entnommen und bis zur titrimetrischen Bestimmung bei –20 °C gelagert.

#### **6.8.1.2 Abbau niedermolekularer Modellester (Feststoffe)**

Zur Untersuchung der enzymatischen Spaltung der bei Raumtemperatur festen niedermolekularen Modelldiester (1,4-Bis(benzoyloxy)butan 3, Adipinsäurediphenylester 4, Adipinsäuredicyclohexylester 6, 1,4-Bis(phenylacetoxyl)butan 7) wurden Partikelfractionen von 0,2 bis 0,3 mm Partikeldurchmesser gesiebt und 30 mg Feststoffpulver anstelle von Polymerfilmen für den pH-Stat Titrationsversuch bei 37 °C eingesetzt. Zur Verringerung des Aufschwimmens der Partikel wurde die Reaktionslösung nach Enzymzugabe (256 µl der Enzymlösung von PsL mit 4 mg Feststoff·ml<sup>-1</sup>) durch dreimaliges Aufziehen der Lösung in den Spitzenaufsatz einer 1-ml Kolbenhubpipette durchmischt.

Die bei der Meßtemperatur von 37 °C flüssigen Modelldiester, 1,4-Bis(cyclohexan-carbonyloxy)butan 5 und Dibutyladipat 1, wurden in der oben beschriebenen Emulsions-

lösung vermessen. Anstelle der sonst üblichen 400 µl Substratlösung, wurden jedoch nur 44 mg Substratlösung eingewogen, mit 4 ml Emulsionslösung und 4 ml dest. Wasser versetzt und nach 1-minütigem Durchmischen mittels Ultra-Turrax ( $13500 \text{ U min}^{-1}$ ) ein Aliquot von 5,5 ml entnommen und in das Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zusatz von 244 µl dest. Wasser und 256 µl der Enzymlösung von PsL mit  $4 \text{ mg}_{\text{Feststoff}} \cdot \text{ml}^{-1}$  wurde der titrimetrische Abbauprobversuch bei  $37^\circ\text{C}$  gestartet.

#### 6.8.1.3 Abbau aromatischer Oligoester

Zur Untersuchung der enzymatischen Spaltung der aromatischen Oligoester (Zweier und Dreier-Sequenz) wurden Partikelfractionen von 0,2 bis 0,3 mm Partikeldurchmesser gesiebt und ca. 3 mg Feststoffpulver (3,4 mg Zweier-Sequenz und 3 mg Dreier-Sequenz) für einen pH-Stat Titrationsversuch bei  $50^\circ\text{C}$  eingesetzt. Die aromatische Einer-Sequenz (3,3 mg) war zu Versuchsbeginn nahezu vollständig gelöst.

#### 6.8.1.4 Abbau von Polymerfilmen

Zwei Polymerfilme ( $\varnothing$  0,9 cm) wurden mit 70 %iger wäßriger Ethanol-Lösung gespült, mindestens 2 Stunden vakuumgetrocknet und gewogen. Die Polymerfilme wurden in dem Reaktionsgefäß vorgelegt und mit einem solchen Volumen an 0,9 %iger Natriumchloridlösung (pH 7,0, autoklaviert) versetzt, daß nach Zusatz der Enzymlösung ein Gesamtvolumen von 6 ml erreicht wurde. Nach dem Einstellen eines Anfangs-pH-Wertes von 7,0 (+ 0,3), wurde über eine Spritze die Enzymlösung (z.B. 256 µl einer PsL-Stammlösung in 0,9 %iger Natriumchloridlösung mit 4 mg Feststoff pro ml) zugegeben und die Autotitration gestartet.



## 6.8.2 Abbauntersuchungen in Gegenwart von Mikroorganismen

Während in dieser Arbeit bei den enzymatischen Abbauntersuchungen die Spaltung von Esterbindungen erfaßt wurde, war der Massenverlust der Polymerfilme die Meßgröße bei den mikrobiellen Abbauntersuchungen in Kompost, Erde und bei den mikrobiellen Abbauntersuchungen auf Agarplatten.

### 6.8.2.1 Abbauntersuchung in Erde

Zur Simulation des Kunststoffabbaus im Erdreich wurden die Polyesterfilme gemäß DIN 53739 in Erde eingegraben. Von den zu untersuchenden Polyestern wurden jeweils 2 Filme ( $\varnothing$  2,5 cm, für den biologischen Abbau verfügbare Oberfläche eines Fimes: 9,82 cm<sup>2</sup>) für einen bestimmten Zeitraum in ein Weckgläser (1l) eingegraben, das mit Gärtnererde (Zusammensetzung s. unten) eines eingestellten Feuchtigkeitsgehaltes von 60 % (bezogen auf das maximale Wasserrückhaltevermögen) gefüllt war. Jeder Film befand sich dabei zur Vereinfachung des Wiederfindens in je einem beschrifteten, mikrobiell resistenten Polyethylenetz (4 x 4 cm, Maschenweite 3 mm), das mit zuvor gesiebter (Partikeldurchmesser 0,5 cm) Gartenerde (genaue Angaben s.u.) befüllt war (Abb. 6-7). Die zuvor gewogenen Glasbehälter wurden bei 25 °C gelagert und täglich mit destilliertem Wasser auf ihr Ausgangsgewicht eingestellt (zum Ersatz verdunsteten Wassers).

In Abständen von 7 bis 14 Tagen wurde alle Polyester eines Glasgehalters entnommen und mit Wasser gewaschen, 72 h unter Vakuum ( $< 0,1$  mbar) bei 30 °C getrocknet und der Gewichtsverlust gravimetrisch bestimmt. Die flächenbezogenen Massenverluste wurden für jeden Polyester in Abhängigkeit von der Versuchszeit aufgetragen. Aus dem linearen Bereich der so erhaltenen Abbaukurve wurde für jeden Polyester eine Abbaurate berechnet und die Rate der reinen chemischen Hydrolyse subtrahiert.

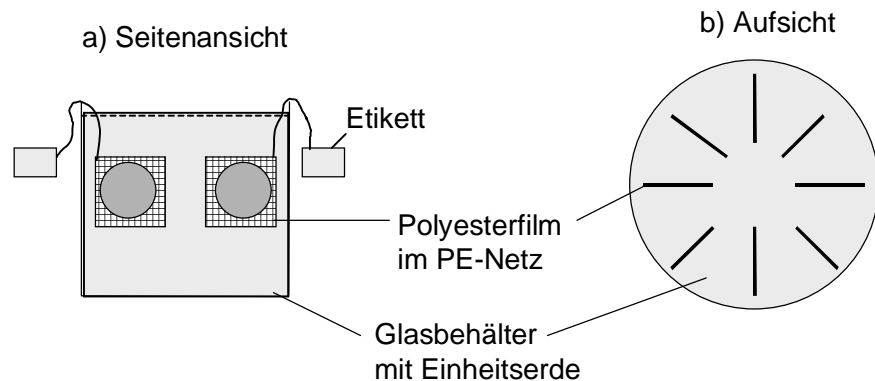
Um den Einfluß der chemischen Hydrolyse zu untersuchen, wurde für jeden Polyester jeweils eine sterilisierte Filmprobe über den maximalen Testzeitraum in 100 ml sterilem Wasser bei 25 °C gelagert. Zur Sterilisation wurden die Polyesterfilme der Bestrahlung einer UV-Lampe (UVC 30, Heraeus Holding GmbH, Hannover, Bestrahlung mit Licht der Wellenlänge 254 nm, 6 W·cm<sup>2</sup> bei einem Abstand von 20 cm), in einem Bestrahlungsabstand von 15 cm und auf einer Bestrahlungsfläche von 18 cm x 38 cm, für jeweils 15 min pro Filmseite ausgesetzt.

### Gärtnererde (Einheitserde „Gärtner Erde Exklusiv“):

Hersteller: Balster Einheitswerk GmbH, Födenberg; Einheitserdewerk A. Stangenberg GmbH, Hameln; Einheitserde- und Humuswerke, Gebr. Patzer KG, Sinnatal-Jossa; Einheitserdewerk Uetersen, W. Tantau GmbH & Co.KG, Uetersen

Zusammensetzung: 25% Ton, 60% Torf, 15% Rindenhumus, 250-350 mg/l Stickstoff verfügbar, 200-300 mg/l Phosphat verfügbar, 250-400 mg/l Kaliomoxid verfügbar, pH(CaCl<sub>2</sub>) 5,5-6,5

Abb. 6-7:  
Abbauuntersuchung in  
Erde.



### 6.8.2.2 Abbauuntersuchungen in Kompost

Unter Kompostierung wird im allgemeinen der aerobe Abbau organischer Stoffe pflanzlicher und tierischer Herkunft durch eine Mischpopulation verschiedener Mikroben und Kleinlebewesen verstanden [EMBERGER 1993].

Als Matrix für die Abbauuntersuchungen wurde Kompost aus der Nachrottephase (Alter ca. 4 Monate, entnommen ca. 50 cm unter der Oberfläche des Haufwerks) von der Kompostieranlage Braunschweig, Watenbüttel, eingesetzt. Während der Abbauuntersuchung erfolgte eine Temperierung mit Hilfe einer externen Heizquelle, da die in Kompost üblicherweise auftretende Eigenerwärmung bei dem geringen Volumen von ca. 2 Litern nicht auftrat.

Als Reaktionsgefäße dienten 3 l-Glasbehälter (Höhe: 30 cm, Durchmesser: 15 cm), die in zwei Schichten, einer unteren 5 cm dicken Schicht aus Tongranulat (Kultursubstrat „Seramis“, Pflanzsubstrat aus behandeltem Ton, Effem GmbH, 27281 Verden/Aller, pH: 6,2-7,5) und darüber einer 15 cm dicken Schicht aus zuvor gesiebttem Kompost (Partikeldurchmesser ca. 20 mm) mit eingestelltem Feuchtigkeitsgehalt von 60 % (bezogen auf das maximale Wasserrückhaltevermögen), befüllt wurden (Abb. 6-8). Zwischen den Schichten befand sich ein PE-Netz, um eine Durchmischung zu verhindern. Die Reaktoren wurden von unten durch perforierte Glasröhren mit wasserdampfgesättigter Druckluft belüftet

(ca.  $6 \text{ l} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Die aus den Reaktoren austretende Druckluft wurde durch eine mit 1 %iger Cetylpyridiumchlorid-Lösung geleitet, um Luftkeime abzutöten.

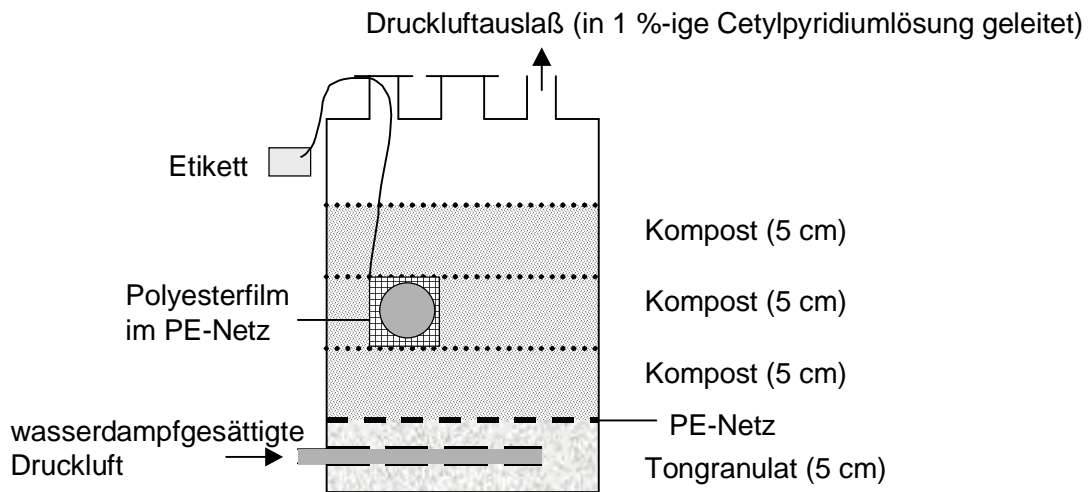


Abb. 6-8: Versuchsaufbau der Abbauuntersuchung in Kompost.

Die Polyesterfilme befanden sich jeweils in beschrifteten, mikrobiell resistenten Polyethylenetzen (4 x 4 cm, Maschenweite 3 mm), die mit zuvor gesiebttem Kompost (Partikeldurchmesser ca. 5 mm) befüllt waren. Je Polyester wurden in einen Reaktor zwei Filme eingegraben. Die Reaktoren wurden, sofern keine anderen Temperaturen angegeben sind, bei 50 °C thermostatisiert.

In Abständen von 7 Tagen wurde alle Polyester eines Reaktors entnommen und mit Wasser gewaschen, 72 h unter Vakuum ( $< 0,1 \text{ mbar}$ ) bei 30 °C getrocknet und der Gewichtsverlust gravimetrisch bestimmt. Die flächenbezogenen Massenverluste wurden für jeden Polyester in Abhängigkeit von der Versuchszeit aufgetragen. Aus dem linearen Bereich der so erhaltenen Abbaukurve wurde für jeden Polyester eine Abbaurate berechnet und die Rate der reinen chemischen Hydrolyse subtrahiert.

Um den Einfluß der rein chemischen Hydrolyse zu untersuchen, wurden analog zu dem oben beschriebenen Erdeingrabeversuch (s. Kapitel 6.8.2.1, ab Seite 147) Sterilproben angesetzt, die bei 50 °C gelagert wurden.

#### Bestimmung des Feuchtegehaltes der Erde und des Komposts:

Die Erde und der Kompost der Erd- und der Komposteingrabeversuche wurden entsprechend DIN 53739 auf einen Feuchtigkeitsgehalt von 60 % (bezogen auf das maximale Wasserrückhaltevermögen) eingestellt. Dazu wurde eine Glasfritte (G2) mit der

festen Matrix (Erde bzw. Kompost) gefüllt, gewogen und in ein Becherglas gestellt. Das Becherglas wurde bis zur oberen Kante der Matrix mit Wasser gefüllt und für 30 min stehen gelassen. Anschließend wurde die Glasfritte herausgenommen und nach kurzem Abtropfen das Gewichtsbestimmung (100 % Wasserrückhaltevermögen) bestimmt. Nach 24-stündigem Trocknen der gefüllten Fritte unter Vakuum ( $< 0,1$  mbar) bei 30 °C erfolgte eine weitere Gewichtsbestimmung (0 % Wasserrückhaltevermögen). Aus den erhaltenen Werten wurde die Ausgangsfeuchtigkeit der Matrix berechnet und die fehlende Flüssigkeitsmenge hinzugegeben (üblicherweise lagen die Feuchten unterhalb des optimalen Wertes von 60 %).

### 6.8.2.3 Abbauuntersuchungen auf Agarplatten

Als Indikator für den Polyesterabbau wurde der Gewichtsverlust von mit Mikroorganismen-Reinkulturen beimpften Polyesterfilmen ( $\varnothing$ : 2,5 cm, Fläche einer Filmseite: 4,91 cm<sup>2</sup>, Anfangsgewichte im Bereich von 50 bis 80 mg, Filmdicke: 105 – 120 µm) auf Mineralsalz-Agarplatten (Zusammensetzung s. Tab. 6-4) bestimmt. Dazu wurden sterilisierte Polyesterfilme (nach Bestrahlung mittels UV-Licht, s. Angaben in 6.8.2.1, ab Seite 147) auf der Agar-Oberfläche in 100 µl einer Sporensuspension (ca.  $10^7$  Zellen pro ml) des Aktinomyeten *Thermomonospora fusca* gelegt. Die Agarplatten (3 Filme je Agarplatte) wurden zum Schutz vor dem Austrocknen in verschlossenen Tüten aus Polyethylen (die gemäß McCARTHY und CROSS, 1984, zwar gasdurchlässig, aber feuchtigkeitsdicht sind) über einen Versuchszeitraum von 8 Tagen bei 40 bzw. 50 °C inkubiert. Am Ende des Testzeitraumes wurden die Polyesterfilm- Reste von den Agarplatten abgehoben, mit Wasser gewaschen und bis zur Gewichtskonstanz unter Vakuum ( $< 0,1$  mbar) bei 30 °C getrocknet. Die Gewichtsverluste der Filme, bezogen auf die angreifbare Filmoberfläche (s. Tab. 6-3, Seite 134), wurden berechnet.

Als Vergleichsproben (unter sterilen Bedingungen) dienten je Polymer 2 Filme, die anstelle der Sporensuspension mit 100 µl sterilem Wasser beimpft wurden. Diese Kontrollen zeigten keinen Gewichtsverlust, der über die methodenbedingte Meßungenauigkeit von  $\pm 0,4$  mg hinausging, so daß ein durch rein chemische Hydrolyse der Polyesterfilme bedingter Gewichtsverlust ausgeschlossen werden konnte.

#### Zusammensetzung der Mineralsalz-Agarplatten:

Die in Tab. 6-4 aufgeführten Salze und 20 g Agar wurden in Wasser gelöst und nach Einstellung des pH-Wertes mit 0,1 M Natronlauge bzw. Salzsäure auf einen Wert von 7,0 für 20 min bei 121 °C und 1 bar Überdruck autoklaviert (Matachana, Zirbus, Osterode). Nach dem Autoklavieren wurde jeweils 1 ml sterilfiltrierte Spurenelement- und Vitaminlösung zugesetzt. Um einer Austrocknung der Agarplatten durch die Inkubation bei Temperaturen

> 40 °C vorzubeugen, wurde ein erhöhtes Medienvolumen von 40 ml pro Agarplatte eingesetzt.

Tab. 6-4: Zusammensetzung des Mineralsalzmediums der MSV-Agarplatten bezogen auf einen Liter deionisiertes Wasser [DIN V 54900-2]

Substanz	Menge
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,75 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,97 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	22,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,2 g
CaCl <sub>2</sub>	27,5 mg
Agar	20 g
Spurenelement-Lösung <sup>a)</sup>	1,0 ml
Vitamin-Lösung <sup>b)</sup>	1,0 ml
pH-Wert	7,0

a) Nacheinander wurden in 10 ml 25 %ige Salzsäure 2,297 g FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 0,07 g ZnCl<sub>2</sub>, 0,1 g MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O; 0,006 g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>; 0,003 g CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0,003 g CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 0,24 g NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; 0,036 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 0,033 g Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O und 0,026 g Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O gelöst. Danach wurde mit deionisiertem Wasser auf ein Volumen von 1 Liter aufgefüllt.

b) In 100 ml deionisiertem Wasser wurden 0,6 mg (+)-Biotin, 2,0 mg Niacinamid, 2,0 mg p-Aninobenzoat, 1,0 mg D-Panthotensäure, 10,0 mg Pyridoxalhydrochlorid; 5,0 mg Vitamin B12; 2,0 mg Folsäure; 5,0 mg Riboflavin; 5,0 mg D,L-6,8-Thioctic acid und 1,0 mg Thiamindichlorid gelöst. Die Lösung wurde sterilfiltriert (Porengröße 0,2 µm) und bis zum Gebrauch in Portionen à 0,5 ml bei –20 °C eingefroren.

#### Charakterisierung der Sporensuspension (Lebendkeimzahl):

Um die Ergebnisse der Abbauuntersuchungen der verschiedenen Versuchsreihen vergleichen zu können, wurde die Lebendkeimzahl von der eingesetzten Sporensuspension von *T. fusca* bestimmt. Dazu wurden die in einem bekannten Volumen einer verdünnten Probe vorhandenen Keime ausgezählt, die makroskopisch sichtbare Kolonien auf einem Agarmedium bildeten. So konnte die „Kolonie bildenden Einheiten“ (KBE) pro ml Ausgangssuspension ermittelt und die für die Abbauuntersuchungen eingesetzte Sporensuspension gegebenenfalls auf ca. 10<sup>7</sup> KBE · ml<sup>-1</sup> eingestellt werden.

#### Durchführung:

In 80 mM Phosphatpuffer (pH 7,1) wurden dekadische Versuchsreihen der Organismensporensuspension hergestellt und aus jeder Verdünnungsstufe je 100 µl auf Agarplatten eines Komplexmediums (TSB-Agar: In 1 l deionisiertem Wasser wurden 30,0 g Tryptic Soy Broth, Merck 5459, gelöst, worin 17,0 g Pepton aus Casein, 3,0 g Pepton

aus Sojamehl, 2,5 g D(+)-Glucose, 5,0 g NaCl und 2,5 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  enthalten sind ( $\text{pH } 7,0 \pm 0,2$ .) mit Hilfe eines Drigalskispatels ausgestrichen. Die Agarplatten (Dreifachbestimmung) wurden 5 Tage bei  $55\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Zur Zählung wurden Agarplatten ausgewählt, deren Kolonienzahl zwischen 20 und 200 lag.

## 7 Literatur

- Abe, H. und Y. Doi „Structural effects on enzymatic degradabilities for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers" International Journal of Biological Macromolecules, 25, 185-192 (1999)
- Akutsu, Y., T. Nakajima-Kambe, N. Nomura und T. Nakahara „Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35" Appl. Environ. Microbiol., 64(1), 62-67 (1998)
- Albertsson, A.-C. und M. Eklund „Short methylene segment crosslinks in degradable aliphatic polyanhydride: Network formation, characterization and degradation" Journal of Polymer Science: Part A, 34, 1395-1405 (1996)
- Aminabhavi, T.M., R.H. Balundgi und P.E. Cassidy „A review on biodegradable plastics" Polym.-Plast. Technol. Eng., 29(3), 235-262 (1990)
- Atkins, P.W., Physikalische Chemie, 2. Auflage, Kapitel 24.2, VCH, Weinheim, 599 (1990)
- Augusta, J., R.-J. Müller und H. Widdecke „Biologisch abbaubare Kunststoffe: Testverfahren und Beurteilungskriterien" Chem.-Ing.-Tech., 64(5), 410-415 (1992)
- Baines, F. „Biodegradation of polyvinyl alcohol" American Association of Textile Chemists and Colorists Symposium, 12, 122-128 (1973)
- Bahari, K., H. Mitomo, T. Enjoji, F. Yoshii und K. Makuuchi „Radiation crosslinked poly(butylene succinate) foam and its biodegradation" Polymer Degradation and Stability, 62, 551-557 (1998)
- BASF AG , Ludwigshafen, Produktbeschreibung Ecoflex (1997)
- Batzer, H. "Polymere Werkstoffe: Chemie und Physik" Band 1, Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1985)
- Benedict, C.V., W.J. Cook, P. Jarrett, J.A. Cameron, S.J. Huang und J.P. Bell „Ungal degradation of polycaprolactones" J. Appl. Polym. Sci., 28, 327 (1983 a)
- Benedict, C.V., J.A. Cameron und S.J. Huang „Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast" J. Appl. Polym. Sci., 28, 335-342 (1983 b)
- Bichler, C., R. Dittler, H.-C. Langowski, A. Starnecker und H. Utz „Biologisch abbaubare Verpackungsmaterialien - Die Lösung des Müllproblems?" Bioengineering, 9(6/93), 9-17 (1993)

- Bisswanger, H. „Theorie und Methoden der Enzymkinetik“ 1. Auflage, Kapitel 2.8, VCH, Weinheim, 126 (1979)
- Bisswanger, H. „Enzymkinetik : Theorie und Methoden“ 2. Auflage, Kapitel 2.10, VCH, Weinheim, 173 (1994)
- Bitritto, M.M., J.P. Bell, G.M. Brenckle, S.J. Huang und J.R. Knox „Synthesis and biodegradation of polymers derived from  $\alpha$ -hydroxy acids" J. Appl. Polym. Sci., Appl. Polym. Symp., 35, 405-414 (1979)
- Blumenthal, F. „Zusammenhänge zwischen Struktur und Kettenbeweglichkeit substituierter Polydiene untersucht mittels der Kernmagnetischen Resonanz“ Dissertation der Universität Hamburg, Fachbereich Chemie (1982)
- Büthe, Fährndrich, Gerold, Hofmann, Klepek, Lammerting, Malburg, Selz, Stutz, Schmidt, Schwenke und Taubermann „Polyurethane: Spezialkunststoffe für Industrie und Handwerk - Verarbeitung, Eigenschaften, Anwendungen“ W. Bartz (Herausg.) Kontakt und Studium: Bd. 186, Kapitel 1, expert verlag, Ehningen bei Böblingen, 1-11 (1989)
- Bourne, J., M. Stacey, J.C. Tatlow und J.M. Tedder "Studies on trifluoroacetic acid. Part I. Trifluoroacetic anhydride as a promoter of ester formation between hydroxy-compounds and carboxylic acids" J. Chem. Soc., 2976-2979 (1949)
- Canetti, M., M. Urso und P. Sadocco „Influence of the morphology and of the supermolecular structure on the enzymatic degradation of bacterial poly(3-hydroxybutyrate)" Polymer, 40, 2587-2594 (1999)
- Cook, W.J., J.A. Cameron, J.P. Bell und S.J. Huang „Scanning electron microscopic visualization of biodegradation of polycaprolactones by fungi" J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed., 19, 159 (1981)
- Cygler, M., P. Grochulski, R.J. Kazlauskas, J.D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin, A.N. Serregi, and A.K. Gupta "A structural basis for the chiral preferences of lipases" J. Am. Chem. Soc., 116, 3180ff (1994)
- Derewenda, U., L. Swenson, R. Green, Y. Wei, S. Yamaguchi, R. Jörger, M.J. Haas und Z.S. Derewenda „Current progress in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi" Protein Engineering , 7(4), 551-557 (1994)
- Desnuelle, P., L. Sarda und G. Ailhard, Biochim. Biophys. Acta, 37, 570-571 (1960)
- Doi, Y., K. Mukai, K. Kasuya und K. Yamada "Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates" in: Y. Doi und K. Fukuda (Herausgeber) „Biodegradable plastics and polymers“ Elsevier Science B.V., New York, 39-51 (1994)



- Doi, Y., Y. Kumagai, N. Tanahashi, K. Mukai, in: M. Vert, J. Feijen, A. Albertsson, G. Scott, E. Chiellini (Herausgeber) „Biodegradable polymers and plastics“ Royal Soc. Spec. Pub. 109, London, S. 139 ff (1992)
- Emberger, J. „Kompostierung und Vergärung“ Vogel Buchverlag (1993)
- Fields, R.D und F. Rodriguez „Microbial degradation of aliphatic polyesters“ Proceedings of the 3. Int. Biodegradation Symposium Sharpley I.M., Kaplan, A.M., EP Appl. Sci. Barking England, 775 (1976)
- Flory, P.J. und A. Vrij „Melting points of linear-chain homologs. The normal paraffin hydrocarbons“ J. Am. Chem. Soc. (85), 3548-3553 (1963)
- Gan, Z., D. Yu, Z. Zhong, Q. Liang und X. Jing „Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone)/poly(DL-lactide) blends in phosphate buffer solution“ Polymer, 40, 2859-2862 (1999)
- Gan, Z., Q. Liang, J. Zhang und X. Jing „Enzymatic degradation of poly( $\epsilon$ -caprolacton) film in phosphate buffer solution containing lipases“ Polymer Degradation and Stability, 56, 209-213 (1997)
- Gilding, D.K. und A.M. Reed „Biodegradable polymers for use in surgery - poly(ethylene oxide) poly(ethyleneterephthalate) (PEO/PET) copolymers: 1“ Polymer, 20, 1454-1458 (1979)
- Hosoya H. u. A „Bacterial degradation of synthetic polymers and oligomers with the special reference to the case of polyethylene glycol“ Agric. Biol. Chem. 42 (8), 1545-1552 (1978)
- Huang, S.J. „Biodegradation“ Comprehensive Polymer Science, 6, 597-606 (1989)
- Huang, S.J. „Biodegradable polymers“ Enzyklopedie of Polymer Sci. and Eng., 2, 220-241 (1985)
- Hopkins, A.J. „Opportunities for waste streams containing PET“ Polymer preprints, DIV of Polym. Chem, ACS, 919 (1993)
- Iwata, T., Y. Doi, S. Nakayama, H. Sasatsuki und S. Teramachi „Structure and enzymatic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) copolymer single crystals with an extracellular PHB depolymerase from *Alcaligenes faecalis* T1“ International Journal of Biological Macromolecules, 25, 169-176 (1999)
- Jaeger, K.-E., A. Steinbüchel und D. Jendrossek „Substrate specificities of bacterial polyhydroxyalkanoate depolymerase and lipases: Bacterial lipases hydrolyze poly( $\omega$ -hydroxyalkanoates)“ Appl. Environm. Microbiol., 61(8), 3113-3118 (1995)

- Jendrossek, D. „Microbial degradation of polyesters: a review on extracellular poly(hydroxyalkanoic acid) depolymerases“ *Polymer Degradation and Stability*, 59, 317-325 (1998)
- Khan, M. A., K.M. Idriss Ali, F. Yoshii und K. Makuuchi „Enzymatic degradation of Bionolle and Bionolle-rubber blends“ *Polymer Degradation and Stability*, 63, 261-264 (1999)
- Kim, Y.J und O.O. Park „Miscibility and biodegradation of poly(butylene succinate)/poly(butylene terephthalate) blends“ *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 7(1), 53-66 (1999)
- Kleeberg, I., C. Hetz, R.M. Kroppenstedt, R.J. Müller und W.-D. Deckwer „Biodegradation of aliphatic-aromatic copolyesters by *Thermomonospora fusca* and other thermophilic compost isolates“ *Appl. Environ. Polym. Degrad.*, 64(5), 1731-1735 (1998)
- Kleeberg, I. „Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von aliphatisch-aromatischen Copolyestern sowie Isolierung und Charakterisierung eines polyesterspaltenden Enzyms“ Dissertation der Technischen Universität Braunschweig (1999)
- Klein, S. „Untersuchungen zum Mechanismus der enzymatischen Hydrolyse von Polyestermaterialien mittels Lipase“ Diplomarbeit der Technischen Fachhochschule Berlin, Fachbereich Chemie- und Biotechnik (1996)
- Koch, R. und H. Lund WO 98/36086 (20.08.1998)
- Langholz, P., P. Andersen, T. Forskov und W. Schmidtsdorff „Application of a specificity of *Mucor miehei* lipase to concentrate docosahexaenoic acid (DHA)“ *JAOCS* (66), 1120-1123 (1989)
- Lenz, R.W. „Biodegradable polymers“ *Adv. Polym. Sci.*, 107, 1-40 (1993)
- McCarthy, A.J. und T. Cross „A taxonomic study of *Thermomonospora* and other monosporic actinomycetes“ *J. Gen. Microbiol.*, 130, 5-25 (1984)
- McCrae, A.R. und R.C. Hammond „Present and future applications of lipases“ *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 3, 200-212 (1985)
- Meier, D., N.-C Hahn und O. Faix „Stickstoffhaltige Düngemittel aus technischen Ligninen“ in: „Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie“ VCH (1996)
- Mochizuki, M., M. Hirano, Y. Kanmuri, K. Kudo und Y. Tokiwa "Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effect of draw ratio on enzymatic degradation" *J. Appl. Polym. Sci.*, 55, 289-296 (1995)

- 
- Müller, P., R. Koch und H. Klein „Warum Bakterien und Pilze die Moleküle der abbaubaren Kunststoffe mögen“ Tagungsbeitrag in Würzburg, K/1-K/18 (1999)
- Müller, R.-J., J. Augusta., T. Walter. und H. Widdecke „The development and modification of some special test methods and the progress in standardisation of test methods in germany“, in: Y. Doi, K. Fukuda (Herausgeber) „Biodegradable Plastics and Polymers“ Elsevier, New York, 237-249 (1994)
- Mukai, K., K. Yamada und Y. Doi „Efficient hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas stutzeri* YM1414 isolated from lake water“ Polym. Degrad. Stab., 43, 319-327 (1994)
- Mukai, K., Y. Doi, Y. Sema und K. Tomita „Substrate specificities in hydrolysis of polyhydroxyalkanoates by microbial esterases“ Biotechnol. Lett., 15(6), 601-604 (1993 a)
- Mukai, K., K. Yamada und Y. Doi „Kinetics and mechanism of heterogeneous hydrolysis of poly(R)-3-hydroxybutyrate film by PHA depolymerase“ Int. J. Biol. Macromol., 15, 361-366 (1993 b)
- Mukai, K., K. Yamada und Y. Doi „Enzymic degradation of poly(hydroxyalkanoates) by a marine bacterium“ Polym. Degrad. Stab., 41(1), 85-91 (1993 c)
- Nagata, M., F. Okano, W. Sakai und N. Tsutsumi „Separation and enzymatic degradation of blend films of poly(L-lactic acid) and cellulose“ Journal of polymer science: Part A, 36, 1861-1864 (1998 a)
- Nagata, M., T. Machida, W. Sakai, and N. Tsutsumi „Synthesis, characterisation and enzymatic degradation studies on the novel network aliphatic polyesters“ Macromolecules, 31, 6450-6454 (1998 b)
- Nagata, M., T. Kiyotsukuri, T. Hasegawa, N. Tsutsumi und W. Sakai „Synthesis and enzymatic degradation of aliphatic polyesters copolymerized with trimesic acid“ J.M.S.-Pure Appl. Chem.: Part A, 34(6), 965-973 (1997 a)
- Nagata, M., H. Ibuki, W. Sakai und N. Tsutsumi „Synthesis, characterisation and enzymatic degradation of novel regular network aliphatic polyesters based on pentaerythritol“ Macromolecules, 30, 6525-6530 (1997 b)
- Nagata, M., T. Kiyotsukuri, H. Ibuki, N. Tsutsumi, and W. Sakai, "Synthesis and enzymatic degradation of regular network aliphatic polyesters“ Reactive and functional Polymers, 30, 165-171 (1996)
- Nakayama, A., T. Higashi, J. Iyoda, M. Ukita, K. Hayashi und N. Yamamoto „Biodegradability of copolymers of  $\epsilon$ -caprolactone with lactams“ Chem. Express, 8(3), 181-184 (1993)

- Noble, M.E.M., A. Cleasby, L.N. Johnson, M.R. Egmond und L.G.J. Frenken "Crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glumae* reveals a partially redundant catalytic aspartate" FEBS Letters, 331(1,2), 123-128 (1993)
- Novo Industri, Analytical Method, number: AF 95/5 GB
- Ohura, T., K.-I. Kasuya und Y. Doi „Cloning and characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase gene of *Pseudomonas stutzeri* and analysis of the function of substrate-binding domains“ Appl. Environ. Microbiol., 65(1), 189-197 (1999)
- Organikum: „Organisch-chemisches Grundpraktikum“ 18. Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 638 (1990)
- Parikh, M., R.A. Gross und S.P. McCarthy „The effect of cristalline morphology on enzymatic degradation kinetics“ in: Ching C., Kaplan D.L. und E.L. Thomas (Herausgeber) "Biodegradable Polymers and Packaging" Technomic Publishing AG, Basel, 159-169 (1994)
- Parikh, M., R.A. Gross und S.P. McCarthy „The effect of crystalline morphology on enzymatic degradation kinetics" PMSE, 66, 408-410 (1992)
- Peter M.G.und L.A. Köhler „Perspektiven nachwachsender Rohstoffe in der Chemie“ 328-331, VCH (1996)
- Peters, T. „Vergleich verschiedener Testsysteme zur Untersuchung des biologischen Abbaus von Kunststoffen“ Diplomarbeit der Fachhochschule Rheinland-Pfalz, Abteilung Bingen, Fachbereich Verfahrenstechnik (1995)
- Rohwer, G. "Enzym-Polymer-Wechselwirkungen bei biologisch abbaubaren Kunststoffen“ Diplomarbeit der Technischen Fachhochschule Berlin (1994)
- Sakai, K., N. Hamada und Y. Watanabe „Degradation mechanism of poly(vinyl alcohol) by successive reactions of secondary alcohol oxidase and  $\beta$ -diketone hydrolase from *Pseudomonas sp.*" Agric. Biol. Chem., 50(4), 989-996 (1986)
- Sakazawa, C., M. Shimao, Y. Taniguchi und N. Kato „Symbiotic utilization of polyvinyl alcohol by mixed cultures“ Applied and Environmental Microbiology, 41(1), 261-267 (1981)
- Scandola M., Focarete M.L., Adamus G., W. Sikorska, I. Baranowska, S. Swierczek, M. Gnatowski, M. Kowalcruk und Z. Jedlinski „Polymer blends of natural poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and a synthetic atactic poly(3-hydroxybutyrate). Characterization and biodegradation studies“ Macromolecules, 30, 2568-2574 (1997)

- Schirmer, A., D. Jendrossek und H.G. Schlegel „Degradation of poly(3-hydroxyoctanoic acid) [P(3HO)] by bacteria: Purification and properties of a [P(3HO)] depolymerase from *Pseudomonas fluorescens* GK13" Appl. Environm. Microbiol., 59(4), 1220-1227 (1993)
- Schrag, J.D., Y. Li, M. Cygler, D. Lang, T. Burgdorf, H.-J. Hecht, R. Schmid, D. Schomburg, T.J. Rydel, J.D. Oliver, L.C. Strickland, C.M. Dunaway, S.B. Larson, J. Day und A. McPherson "The open conformation of a *Pseudomonas* lipase" Structure, 5(2), 187-202 (1997)
- Schrag, J.D., Y. Li, S. Wu und M. Cygler „Ser-His-Glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichum candidum*" Nature, 351, 761-764 (1991)
- Spyros, A., R. Kimmich, B.H. Briesse und D. Jendrossek „<sup>1</sup>H NMR imaging study of enzymatic degradation in poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate). Evidence for preferential of the amorphous phase by PHB depolymerase B from *Pseudomonas lemoignei*" Macromolecules, 30, 8218-8225 (1997)
- Stryer, L. „Serin, Histidin und Aspartat bilden im Chymotrypsin eine katalytische Triade" in: Spektrum der Wissenschaft, Biochemie, Heidelberg, 235-237 (1990)
- Sykes, P „Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie" 9. Auflage, VCH, Weinheim (1988)
- Tabushi, I., H. Yamada, H. Matsuzaki und J. Furukawa „Polyester readily hydrolyzable by chymotrypsin" J. Polym. Sci., Polym. Lett. Ed., 13, 447-450 (1975)
- Tieke, B. „Makromolekulare Chemie: Eine Einführung" VCH, Weinheim (1997)
- Timmins, M.R., R.W. Lenz, P.J. Hocking, R.H. Marchessault und R.C. Fuller „Effect of tacticity on enzymic degradability of poly(β-hydroxybutyrate)" Macromol. Chem. Phys., 197(4), 1193-1215 (1996)
- Timmins, M.R. und R.W. Lenz "Enzymatic biodegradation of polymers" Reviews, 15-19 (1994)
- Tokiwa, Y., T. Ando, T. Suzuki und T. Takeda „Biodegradation of synthetic polymers containing ester bonds" Polym. Mater. Sci. Eng., 62, 988-992 (1990)
- Tokiwa, Y., T. Suzuki und K. Takeda „Two types of lipases in hydrolysis of polyester" Agric. Biol. Chem., 52(8), 1937-1943 (1988)
- Tokiwa, Y., T. Suzuki und K. Takeda „Hydrolysis of polyesters by *Rhizopus arrhizus* lipase" Agric. Biol. Chem., 50, 1323-1325 (1986)

- Tokiwa, Y und T. Suzuki „Hydrolysis of copolyesters containing aromatic and aliphatic ester blocks by lipase“ J. Appl. Polym. Sci., 26, 441-448 (1981)
- Tokiwa, Y. und T. Suzuki, "Hydrolysis of polyesters by *Rhizopus delemar* lipase" Agric. Biol. Chem., 42(5), 1071-1072 (1978)
- Tokiwa, Y. und T. Suzuki „Hydrolysis of polyesters by lipase“ Nature, 270, 76-78 (1977)
- Tonford, C., Physical Chemistry of Macromolecules, Wiley, New York (1961)
- Valiente, N., T. Lalot, M. Brigodiot und E. Maréchal „Enzymic hydrolysis of phthalic unit containing copolyesters as a potential tool for block length determination“ Polymer Degradation and Stability, 61, 409-415 (1998)
- Van der Zee, M. „Structure-biodegradability relationships of polymeric materials“ Dissertation University of Twete, Kapitel 7, Enschede, Netherlands, 91-108 (1997)
- Vasel, B. „Die Tertiärstruktur der Lipase von *Rhizomucor miehei* (RML) bei 293 und 110 Kelvin und computergestützte Modellierung von Substrat/Enzym Komplexen der RML und der humanen Leukozyten-Elastase“ Doktorarbeit der Technischen Universität Braunschweig, 113-116 (1992)
- Verger, R., C.E Mieras und G.H. de Haas „Action of phospholipase A at interfaces“ J. Biol. Chem., 248, 4023-4034 (1973)
- Verger, R., H. De Haas, L. Sarda und P. Desnuelle „Purification from porcine pancreas of two molecular species with lipase activity“ Biochim. Biophys. Acta, 188, 272-282 (1969)
- Vollhardt, K.P.C. „Organische Chemie“ 1. Auflage, VCH, Weinheim (1988)
- Vollmert, B. „Grundriss der Makromolekularen Chemie“ Band IV, E. Vollmert-Verlag, Karlsruhe (1988)
- Walter, A., mündliche Mitteilung (1999)
- Walter, T., J. Augusta, R.-J. Müller, H. Widdecke und J. Klein „Enzymatic degradation of a model polyester by lipase" Enzyme Microb. Technol., 17, 218-224 (1995)
- Warzelhan, V., G. Schornick, B. Bruchmann, U. Seelinger, M. Yamamoto und P. Bauer, Patent Offenlegungsschrift DE 4440858 A1, Anmeldetag: 15.11.1994 Offenlegung: 23.05.1996

- 
- Welzel, K. "Untersuchungen zum biologischen Abbau von Polyestern in dreidimensionalen Netzwerken" Diplomarbeit der Technischen Universität Braunschweig (1999)
- Witt, U., M. Yamamoto, U. Seeliger, R.-J. Müller und V. Warzelhan „Biologisch abbaubare Polymerwerkstoffe - nicht die Rohstoffquelle, sondern die chemische Struktur entscheidet über die Abbaubarkeit" *Angew. Chem.*, 111(10), 1540-1544 (1999)
- Witt, U., R.-J. Müller und W.-D. Deckwer „Biodegradation behaviour and material properties of aliphatic/aromatic polyesters of commercial importance" *J. Environ. Polym. Degrad.*, 5(2), 81-89 (1997)
- Witt, U. „Synthese, Charakterisierung und Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit von anwendungsorientierten biologisch abbaubaren aliphatisch/aromatischen Copolyestern" Dissertation der Technischen Universität Braunschweig (1996)
- Witt, U., R.-J. Müller und W.-D. Deckwer „Biodegradation of polyester copolymers containing aromatic compounds" *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.: Part A*, 32(4), 851-856 (1995 a)
- Witt, U., R.-J. Müller und W.-D. Deckwer „New biodegradable polyester-copolymers from commodity chemicals with favorable use properties" *J. Environ. Polym. Degrad.*, 3(4), 215-223 (1995 b)
- Yamadera, R. und M. Murano „The determination of randomness in copolyesters by high resolution nuclear magnetic resonance" *Journal of Polymer Science: Part A-1*, 5, 2259-2268 (1967)
- Yoo, E.S. und S.S. Im „Effect of crystalline and amorphous structures on biodegradability of poly(tetramethylene succinate)" *Journal of Environmental Polymer Degradation*, 7(1), 19-26 (1999)





## 8 Anhang

Abb. 8-1:  
Enzymkinetik für das Substrat  
Dibutylterephthalat in einer  
Emulsionslösung mittels  $10,7 \mu\text{g}_{\text{Protein}}$   
Lipase von *P. spezie*s (0,32 U) bei  
37°C im pH-Stat Titrationsversuch bei  
pH 7,0.

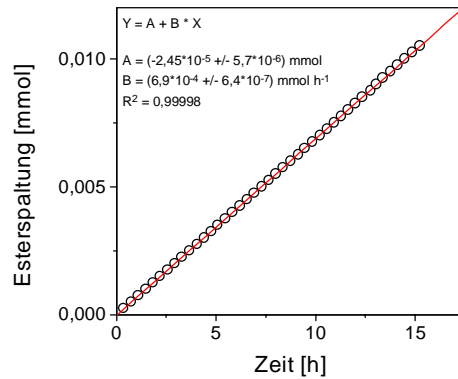


Abb. 8-2:  
Enzymaktivität der Lipase von  
*P. spezie*s bei 37° C gegenüber  
dem Modellester Adipinsäure-  
dibutylester 1 (Emulsionslösung  
nach NOVO INDUSTRI) in  
Abhängigkeit von der Lipase-  
menge und Lipaseaktivität (Units,  
gemäß Herstellerangaben).

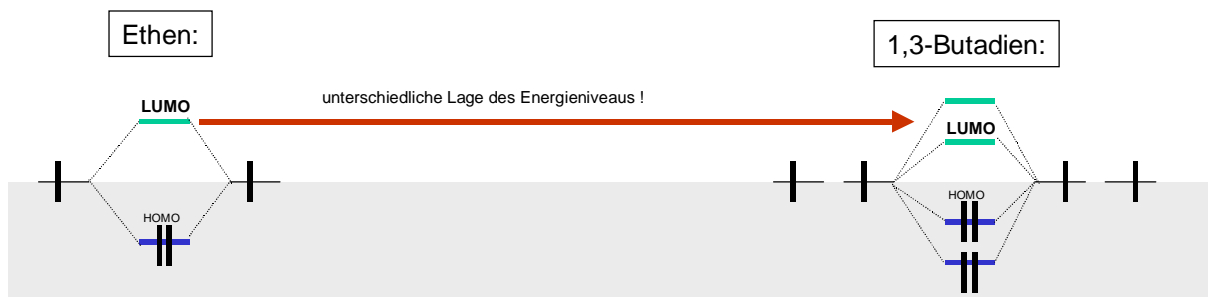
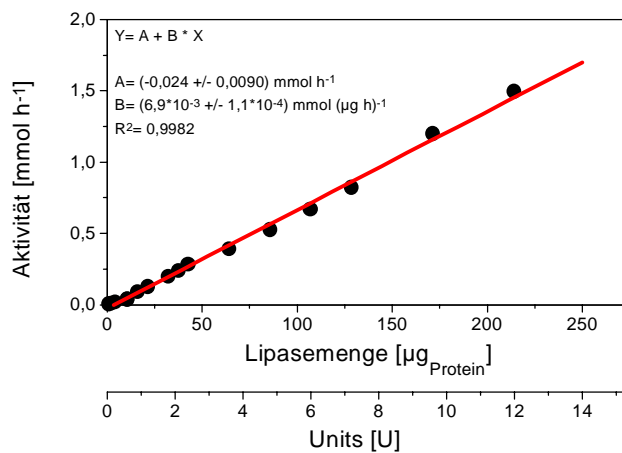


Abb. 8-3: Vergleich der energetischen Lagen von Molekülorbitalen des Ethen und des Butadien. LUMO: lowest unoccupied molecular orbital; HOMO: highest occupied molecular orbital

Tab. 8-1: Berechnete Säure- bzw. Alkoholkonzentrationen unter den Randbedingungen des enzymatischen Abbautests unter Annahme einer vollständigen Hydrolyse der niedermolekularen Modellester.

Säure/Alkohol M [g·mol <sup>-1</sup> ]	Modellester Nr. <sup>a)</sup>	Konzentration <sup>b)</sup> [g (100ml) <sup>-1</sup> ]	Löslichkeit <sup>c)</sup> [g (100ml) <sup>-1</sup> ]
Cyclohexancarbonsäure M:128,2	5	0,41	0,2 (21 °C)
Benzoessäure M:122,1 Natriumbenzoat M:144,1	3	0,41	0,34 (25 °C) 56,3 (25 °C)
Phenyllessigsäure M:136,2	7	0,42	1,8 (25 °C)
Adipinsäure M:146,1	4, 6	0,24	1,4 (15 °C)
Phenol M:94,1	4	0,32	∞ (>65)
Cyclohexanol M:100,2	6 3	0,32 0,15	∞ (k.A.) <sup>d)</sup>
1,4-Butandiol M:90,1	3, 5 7	0,15 0,14	∞ (k.A.) <sup>d)</sup>

- a) Niedermolekularer Modellester (Struktur s. Tab. 4-3, Seite 28), nach dessen Spaltung die angegebene Säure- bzw. Alkoholkomponente frei wird.
- b) Unter der Voraussetzung einer 100 %igen Spaltung aller vorhandenen Esterbindungen entstehend bei der Hydrolyse von jeweils 30 mg des angegebenen Modellesters die angegebenen Alkohohl- und Säurekonzentrationen unter den Randbedingungen der enzymatischen Abbauntersuchungen (6 ml Gesamtvolumen).
- c) Löslichkeit in Wasser bei der jeweiligen in Klammern angegebenen Temperatur [CHEMIKEREKALENDER]
- d) keine Temperaturangabe

Abb. 8-4:  
Aktivität der Lipase von *P. spezie* bei 37° C gegenüber SP 4/6 in Abhängigkeit von der eingesetzten Proteinmenge.

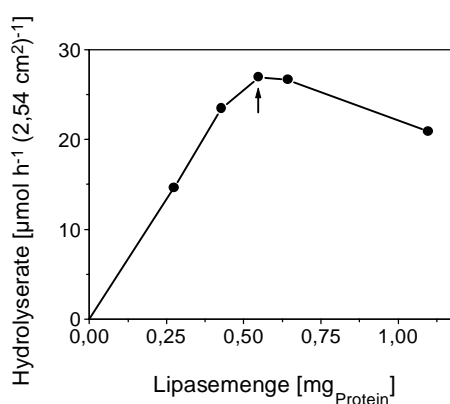


Abb. 8-5:  
Enzymatische Abbaukurven des  
Polyesters SP 4/6 bei 37°C unter  
Variation der Proteinmengen der Lipase  
von *P. spezie*s

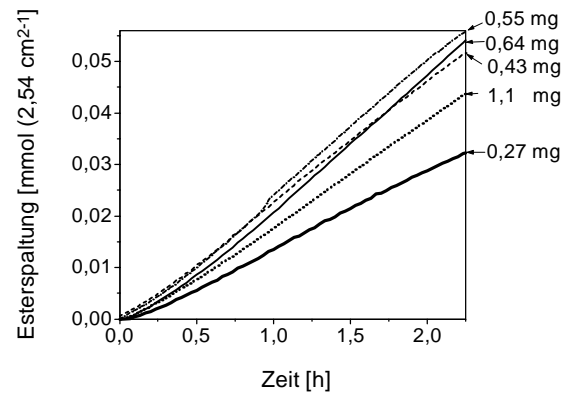


Abb. 8-6:  
Temperaturabhängige Löslichkeit der  
alkoholterminierten, aromatischen  
Einer- bzw. Zweier-Sequenz in  
destilliertem Wasser.

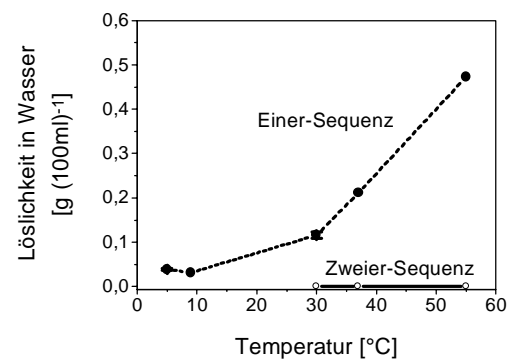


Abb. 8-7:  
Bindungslängen und Bindungswinkel von  
organischen Verbindungen [SYKES 1988].

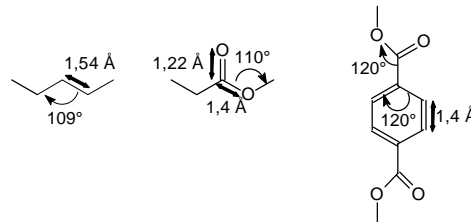


Abb. 8-8:  
Berechnung der  
Länge einer  
Repetiereinheit des  
Copolyesters  
BTA<sub>altern.</sub> 50:50.

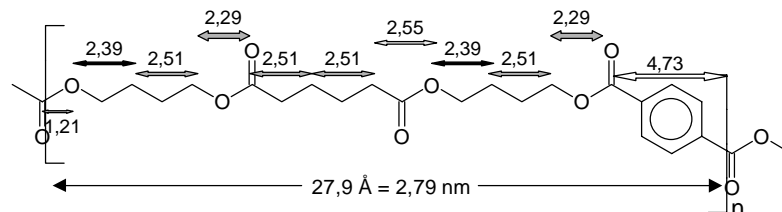
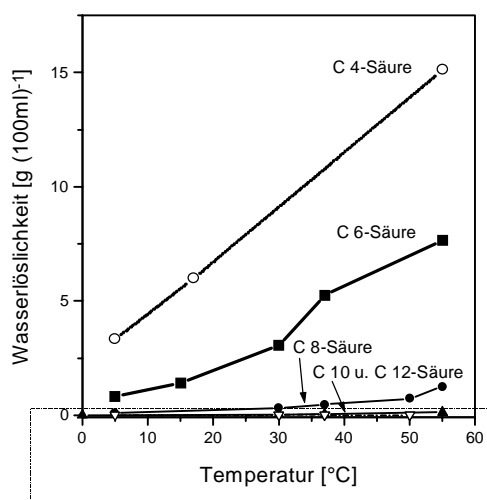
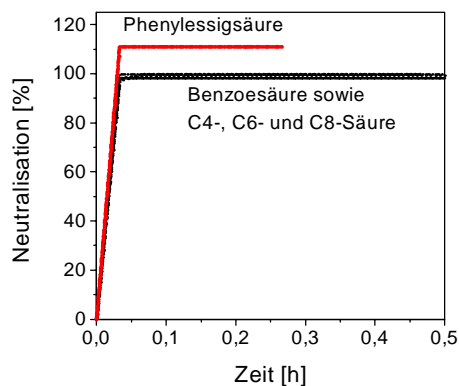


Abb. 8-9:

Vergleich der Neutralisationsgeschwindigkeiten zweier aromatischer Säuren (Phenyllessig- und Benzoesäure) mit der von kurzkettigen aliphatischen Säure (C4-Säure= Bernsteinsäure, C6= Adipinsäure, C8= Korksäure) in der pH-Stat Titration bei pH 7,0 und 37 °C.

Bei Phenyllessigsäure kam es zur Übertitration mit einem Endwert von pH 9,9.



Vergrößerung:

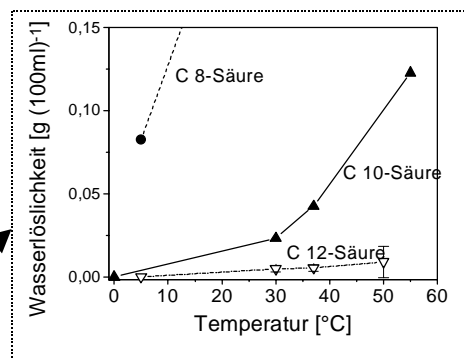
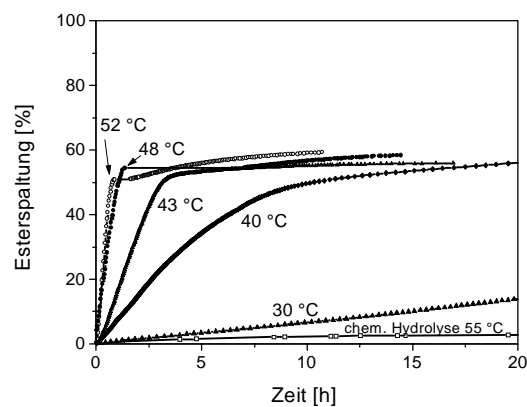


Abb. 8-10: Zunahme der Löslichkeit von aliphatischen Disäuren unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge (C 4= Bernsteinsäure, C 6= Adipinsäure, C 8= Korksäure, C 10= Sebacinsäure, C 12= Dodecandisäure) in destilliertem Wasser. Zur Verdeutlichung ist rechts der untere Ausschnitt der Graphik vergrößert dargestellt.

Abb. 8-11:  
Abbaukurven von PCL mittels Lipase von  
*P. spezie* bei unterschiedlichen  
Meßtemperaturen.



Tab. 8-2: Charakterisierung der Präpolyester bezüglich Molmasse ( $\bar{M}_n$ ) und der vernetzten Polyester bezüglich Quellungsgrad und extrahierbarem Anteil.

Prä-polyester	$\bar{M}_n$ [g·mol <sup>-1</sup> ] (gemessen) <sup>a)</sup>	$\bar{M}_n$ [g mol <sup>-1</sup> ] (berechnet) <sup>b)</sup>	Endgruppen <sup>c)</sup> [mol (g Polyester) <sup>-1</sup> ]	Quellungsgrad [ml CHCl <sub>3</sub> /g Polymer]	Extrahierbarer Anteil [%]
SP 3/4 I	5500	4300	$4,65 \cdot 10^{-4}$	7,5	9,0
SP 3/4 II	8100	5900	$3,83 \cdot 10^{-4}$	9,2	10,8
SP 3/4 III	12600	6400	$3,12 \cdot 10^{-4}$	11,3	14,2
SP 3/4 IV	12900	6600	$3,02 \cdot 10^{-4}$	14,1	18,1
SP 3/6 I	2800	3800	$5,21 \cdot 10^{-4}$	9,9	9,3
SP 3/6 II	6400	4100	$4,88 \cdot 10^{-4}$	12,2	18,1
SP 3/6 III	9700	4800	$4,19 \cdot 10^{-4}$	15,2	22,0
SP 3/6 IV	10900	6000	$3,34 \cdot 10^{-4}$	18,5	25,4
SP 3/6 V	19900	8700	$2,29 \cdot 10^{-4}$	31,4	36,1

a) GPC-Messung mit Polystyrol als Standard.

b) Berechnung gemäß Gleichung (6-6).

c) Berechnung gemäß Gleichung (6-5).

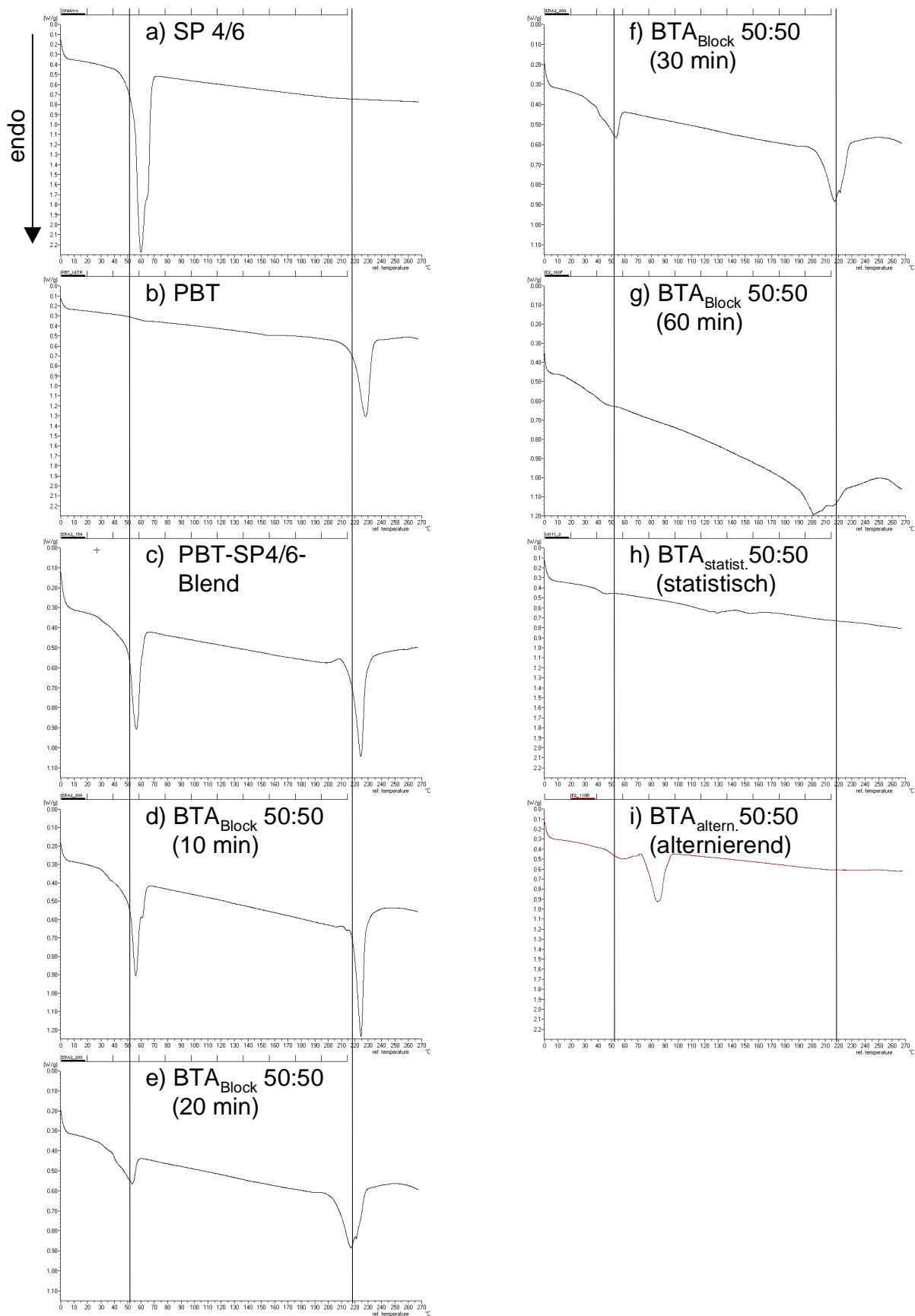
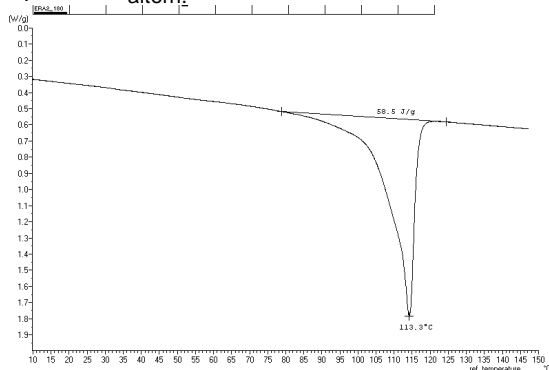


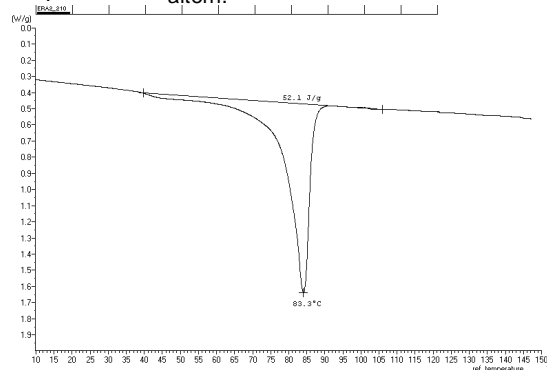
Abb. 8-12: DSC Kurven von Polyestern mit 50 mol-% Terephthalsäure über einen einheitlichen Temperaturbereich von 0 bis 270 °C mit Hilfslinien bei 50 und 220 °C. Für die

Homopolyester SP 4/6, PBT sowie die aliphatisch-aromatischen Copolyester  $\text{BTA}_{\text{altern. 50:50}}$  und  $\text{BTA}_{\text{stat. 50:50}}$  ist ein Wärmebereich von 0 bis  $2,3 \text{ W g}^{-1}$ , ansonsten von 0 bis  $1,15 \text{ W g}^{-1}$  dargestellt. Die Kurven der Homopolyester SP 4/6 und PBT dienen dem Vergleich.

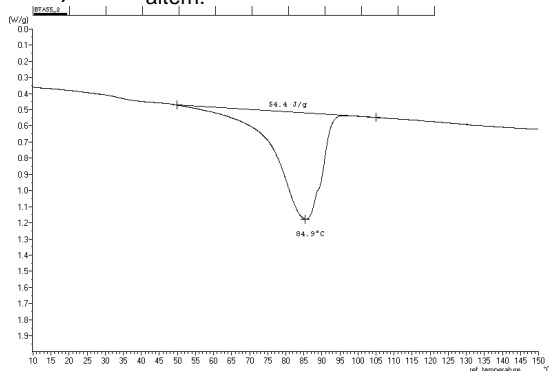
a)  $\text{BTSu}_{\text{altern. 50:50}}$



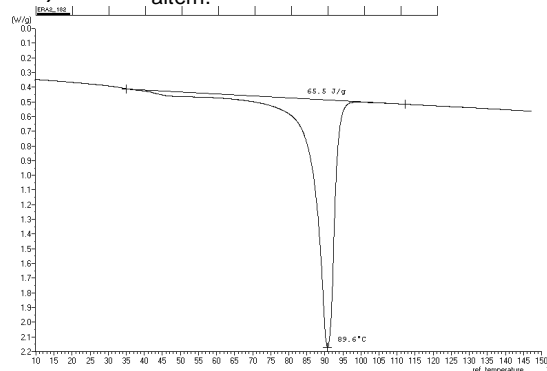
d)  $\text{BTSeb}_{\text{altern. 50:50}}$



b)  $\text{BTA}_{\text{altern. 50:50}}$



e)  $\text{BTDo}_{\text{altern. 50:50}}$



c)  $\text{BTK}_{\text{altern. 50:50}}$

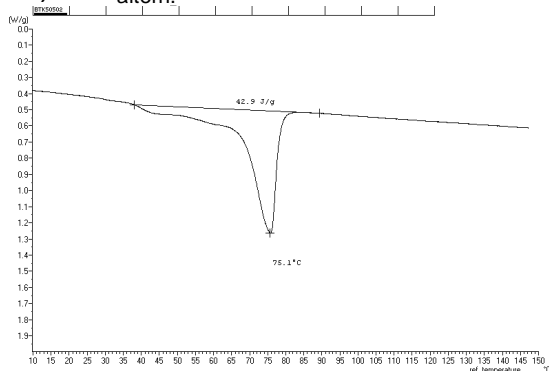
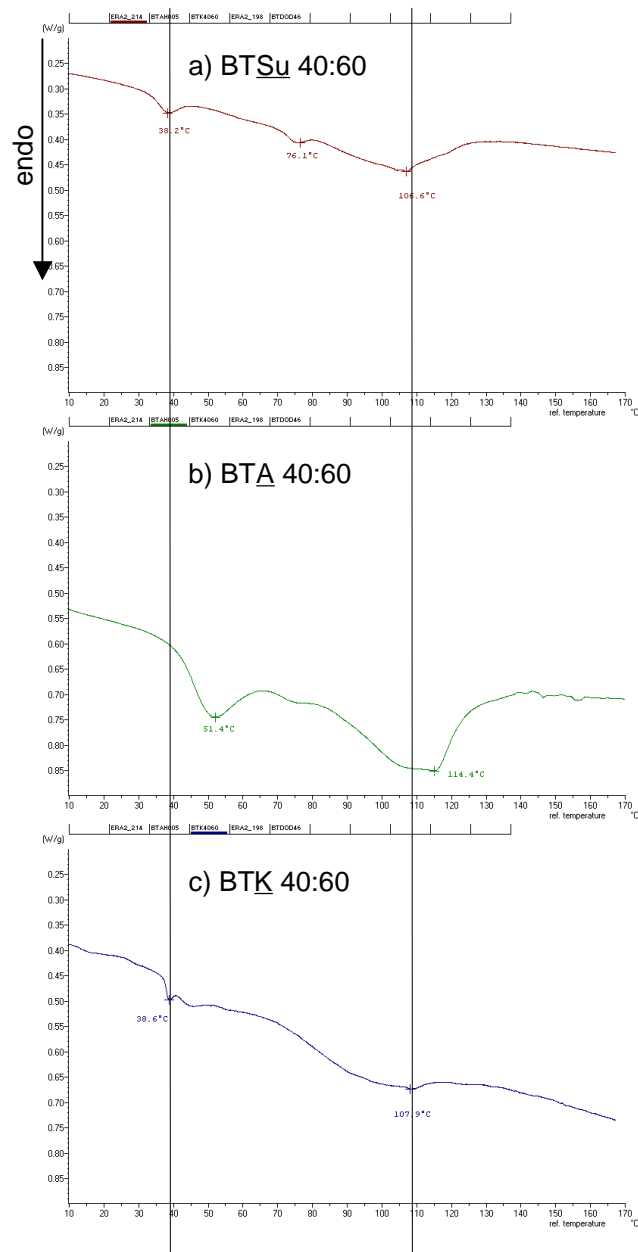


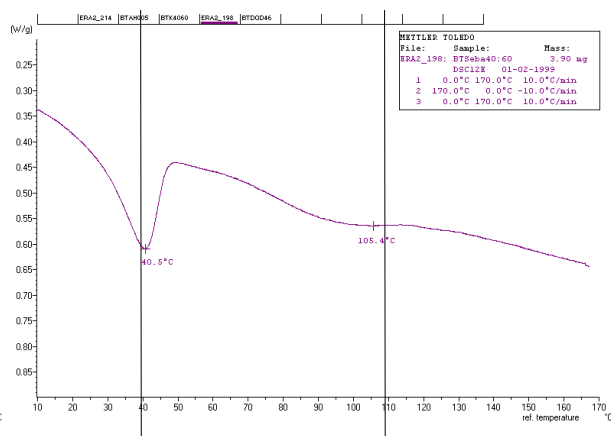
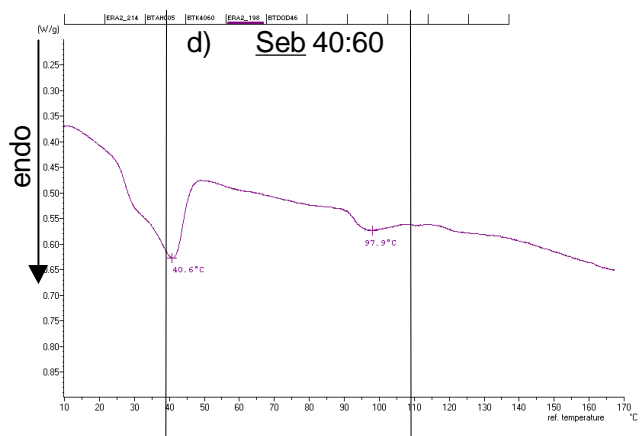
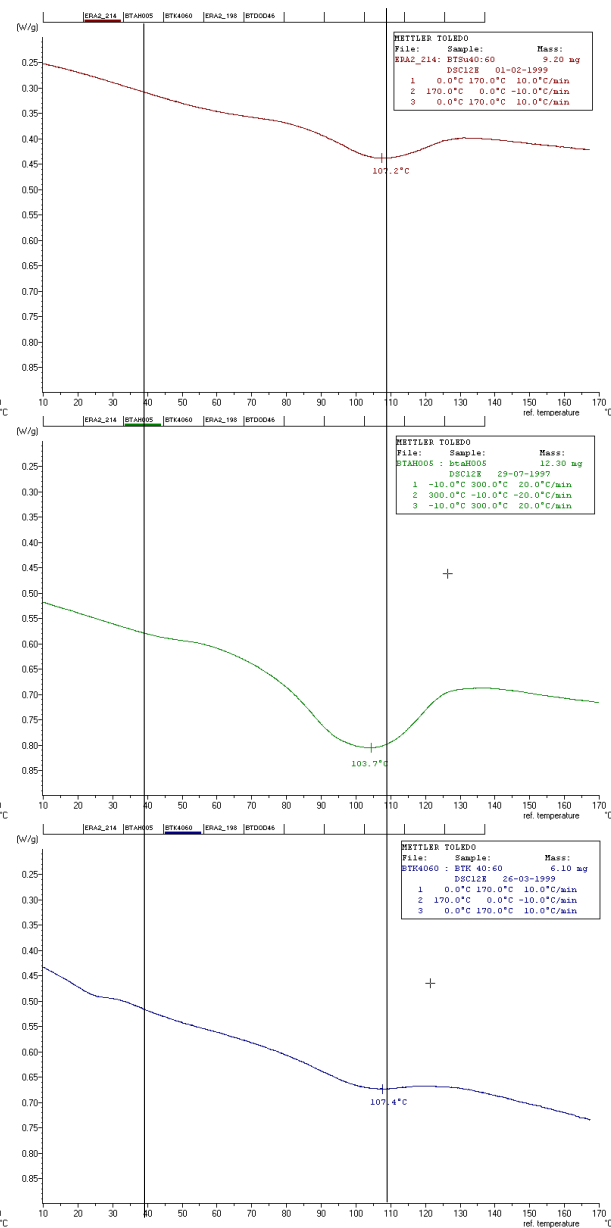
Abb. 8-13: DSC-Kurven von alternierenden aliphatisch-aromatischen Copolyestern

$\text{BTX}_{\text{altern. 50:50}}$  mit unterschiedlichen aliphatischen Disäuren X. Temperaturprogramm:  $-10 - 150^{\circ}\text{C}$  ( $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), Einwaagen: 5,6 bis 6,6 mg. Die Kurven sind für den Temperaturbereich (Abzisse) von 10 bis  $150^{\circ}\text{C}$  und einem Wärmebereich (Ordinate) von 0,9 bis  $0,2 \text{ W g}^{-1}$  dargestellt.

## 1. Aufheizkurve



## 2. Aufheizkurve



-Fortsetzung s. nächste Seite-



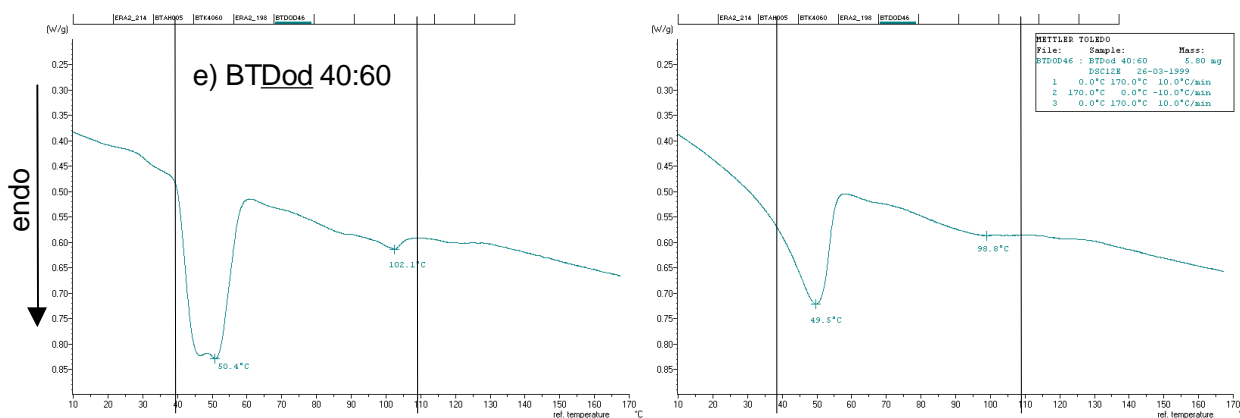


Abb. 8-14: DSC-Kurven (links: 1. Lauf, rechts: 2. Lauf) der statistischen Copolyester BTX 40:60 mit unterschiedlichen Disäuren X. Temperaturprogramm: 1. Lauf: 0 – 170 °C (10 K min<sup>-1</sup>), Abkühlung: 170 – 0 °C (10 K min<sup>-1</sup>), 2. Lauf: 0 – 170 °C (10 K min<sup>-1</sup>). Die Kurven sind für den Temperaturbereich (Abzisse) von 10 bis 170 °C und einem Wärmebereich (Ordinate) von 0,2 bis 0,9 W g<sup>-1</sup> dargestellt. Bei 40 und 110 °C sind Hilfslinien eingezeichnet. Thermoplastisch verarbeitbar waren alle Copolyester erst oberhalb von 98 bis 107 °C.

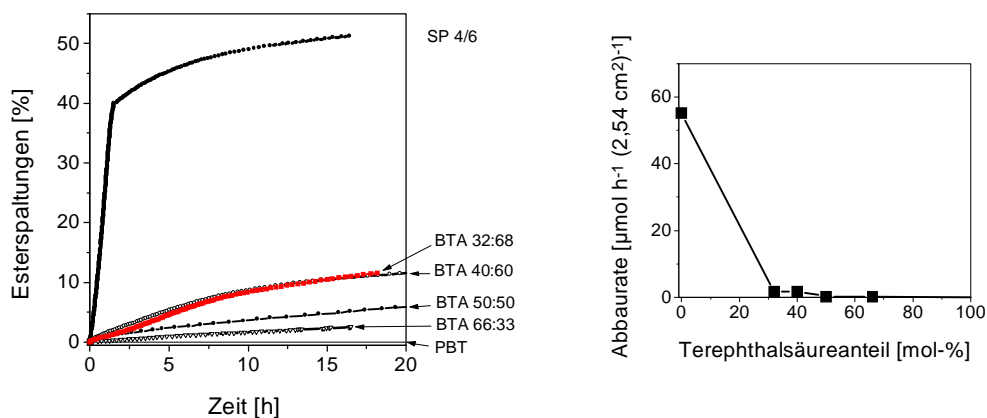


Abb. 8-15: Zeitabhängige Abbaukurven (links) von BTA-Copolyestern und aus den Steigungen ermittelte Abbauraten (rechts) in Abhängigkeit von dem Terephthalsäureanteil mittels Lipase von *P. spezie* bei 50 °C .

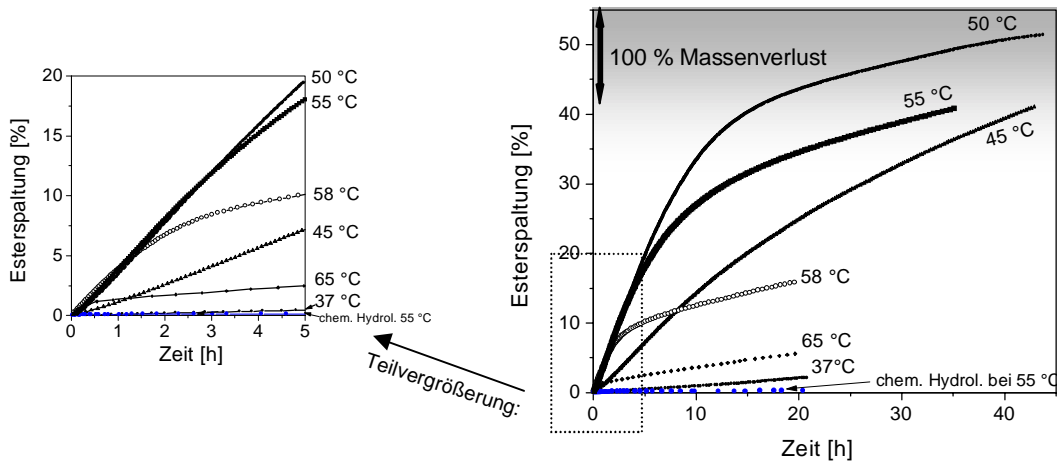


Abb. 8-16: Zunahme der enzymatischen Abbaugeschwindigkeit des alternierenden Copolyesters  $BTA_{\text{altern.}50:50}$  mit zunehmender Meßtemperatur mittels Lipase von *P. spezie*.

Abb. 8-17:  
Zeitabhängige Abbaukurven von  
BTA-Copolyestern mit 50 mol-%  
Terephthalsäure mittels Lipase von  
*T. fusca* bei 55 °C.  
Die Abbauversuch des  
Homopolyesters SP 4/6 wurde bei  
nur 50 °C durchgeführt.

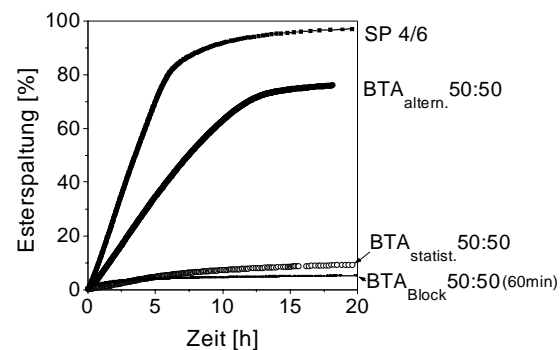
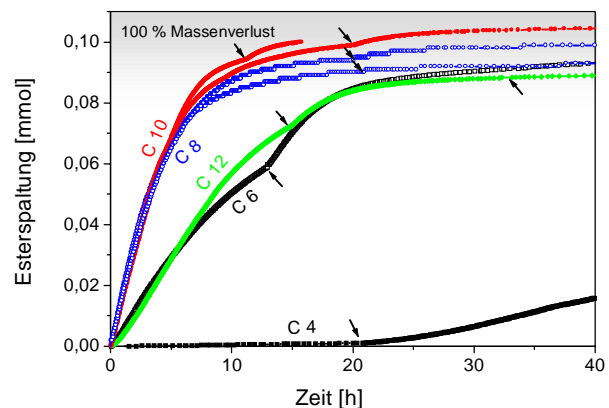


Abb. 8-18:  
Abbaukurven von alternierenden  
aliphatisch-aromatischen Copolyestern  
 $BTX_{\text{altern.}50:50}$  mit aliphatischen Disäuren  
unterschiedlicher Kohlenstoffkettenlänge  
(C 4= Succinic acid, C 6= Adipinsäure,  
C 8= Korksäure (Doppelbestimmung),  
C 10= Sebacinsäure (Doppelbestimmung),  
C 12= Dodecandisäure) mittel Lipase von  
*P. spezie* bei 50 °C. Die Pfeile zeigen  
eine erneute Enzymzugabe an.



# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Elke Marten, geb. Rantze  
geboren am 07.11.1967 in Quakenbrück

verheiratet  
1 Sohn, geboren im September 1997

## Schule / Berufsausbildung

09/80 - 05/87     Artland-Gymnasium Quakenbrück, Abschluß: Abitur  
08/87 - 07/89     Berufsfachschule für Chemie und Pharmazie Dr. v. Morgenstern,  
Braunschweig  
Abschluß: Biologisch-technische Assistentin

## Berufstätigkeit

08/89 - 09/90     Biologisch-technische Assistentin bei der Gesellschaft für  
Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig

## Studium / Auslandsstudium

10/90 - 01/96     Studium der Chemie, Universität Hannover  
Abschluß: Diplom-Chemikerin  
10/93 - 03/94     Auslandsstudium, Universität Paris XI, Frankreich  
Fachbereich Organische Chemie  
07/95 - 01/96     Diplomarbeit, Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH,  
Braunschweig  
Bereich: Prozeßentwicklung  
  
Publikation: Petsch, D.; E. Rantze und B. Anspach: *Selective adsorption of  
endotoxin inside a polycationic network of flat-sheet microfiltration membranes.*  
Journal of Molecular Recognition 11 (1998) 222-230

## Praktika

07/91 - 09/91,     Weserland Textilchemie GmbH, Hannover  
3/92,  
09/94 - 10/94     Qualitätsmanagement, Analytik, Rezepturoptimierung von vulkanisierten  
Kautschuken

## Promotion

02/96 – 07/99     Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH, Braunschweig  
Bereich: Umweltverfahrenstechnik

## Berufliche Laufbahn

seit 03/00     Elastogran GmbH, Lemförde: Forschung Spezialelastomere